

Aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Rolle der Proteinkinase CK2 bei Differenzierungsprozessen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2016

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Lisa Maria Schwind
geb. am 14.08.1987 in Saarlouis

Abkürzungsverzeichnis

λ	Absorption
A	Alanin
Abb.	Abbildung
A. deion.	Deionisiertes Wasser
ADP	Adenosin-Diphosphat
AK	Antikörper
AMP	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMP	"bone morphogenic protein"
bp	Basenpaare
BSA	"bovine serum albumin" (Rinderserumalbumin)
bZIP	basischer Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	"complementary DNA" (komplementäre DNA)
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Bindeprotein
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHOP	"C/EBP-homologous protein"
Ci	Curie
CK2	Proteinkinase CK2
CMV	Cytomegalovirus
cpm	"counts per minute" (Zählimpulse pro Minute)
Ct	"Cycle threshold" (Schwellenwert)
C-Terminus	Carboxyterminus
CX-4945	Silmitasertib
D	Aspartat
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	"extracellular matrix" (extrazelluläre Matrix)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Fc-Domäne	"crystallisable fragment"-Domäne
FCS	"fetal calf serum" (fötales Kälberserum)
g	Gramm
G	Gauge (Maßeinheit für Kanülen)
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	"glial fibrillary acidic protein"
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HSP	Hitzeschock-Protein
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
luc	Luciferase
μ	micro
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
max	maximal
MCE	"mitotic clonal expansion" (mitotische klonale Expansion)
miRNA	microRNA
mg	Milligramm
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	"messenger RNA" (Boten-RNA)
MSE	"MOPS-Natriumacetat-EDTA"-Puffer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano
Nestin	neuroepitheliales Stammzellprotein
nm	Nanometer
NSC	neurale Stammzellen
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	optische Dichte
PBS	"phosphate buffered saline"
PBST	PBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
PCA	p-Cumarsäure

PCR	"polymerase chain reaction" (Polymerase Kettenreaktion)
PD	"pull-down"
PPAR	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT- <i>Real time</i> -PCR	Quantitative Reverse Transkriptase <i>Real time</i> -PCR
Q	Quinalizarin, 1,2,5,8-tetrahydroxyanthraquinon
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	"revolutions per minute" (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sepharosekontrolle
SP	Spaltprodukt
SREBP	"sterol regulatory element-binding protein"
SSC	"saline-sodium citrate"
SVZ	Subventrikularzone
T	Threonin
TAE	"Tris-Acetat-EDTA"-Puffer
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	"Tris-Borate-EDTA"-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TBS	"tris-buffered saline"
TBST	TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
TdT	"terminal deoxynucleotidyl transferase" (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	"TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling"
U	Unit
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VL	Volllänge
VP	Vorpräzipitat
W	Watt
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZE	Zellkernextrakt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	5
3.1 Entwicklung und Differenzierung	5
3.1.1 Die neurale Differenzierung	6
3.1.2 Die Adipogenese	9
3.2 Die Proteinkinase CK2 und Differenzierung	13
3.3 Zielsetzung der Arbeit	16
4. MATERIALIEN	17
4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme	17
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
4.1.2 Chemikalien	19
4.1.3 Radiochemikalien	20
4.1.4 Enzyme	20
4.1.5 Experimentelle Kits	20
4.2 Molekulargewichtsmarker	21
4.2.1 DNA-Molekulargewichtsmarker	21
4.2.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	21
4.3 Antikörper	22
4.3.1 Primärantikörper	22
4.3.2 Sekundärantikörper	25
4.4 Bakterienstämme	26
4.5 Zellsysteme	26
4.6 Primer	27
4.7 Plasmide	28
4.8 Puffer und Lösungen	29

5. METHODEN	40
5.1 DNA-Techniken	40
5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion	40
5.1.2 Agarosegelelektrophorese	40
5.1.3 Reisolation aufgetrennter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel	41
5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
5.1.5 Restriktionsverdau von DNA	41
5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	42
5.1.7 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	42
5.1.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	43
5.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien	43
5.1.10 Isolation von genomischer DNA aus 3T3-L1 Zellen	44
5.1.11 Herstellung eines dsDNA-Templates mittels Klenow-Fragment	45
5.2 RNA-Techniken	45
5.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion	45
5.2.2 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (Harnstoff-PAGE)	47
5.2.3 Northern Blot	48
5.2.4 Radioaktiver miRNA-Nachweis	48
5.2.5 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT) <i>real time</i> PCR	49
5.3 Zellkulturtechniken	51
5.3.1 Isolation der Zellen	51
5.3.2 Kultivieren der Zellen	51
5.3.3 Passagieren der Zellen	52
5.3.4 Differenzierung der Zellen	53
5.3.5 Behandlung der Zellen mit CK2-Inhibitoren	54
5.3.6 Tauen von Zellen	54
5.3.7 Einfrieren von Zellen	54
5.3.8 Beseitigung von Kontaminationen	55
5.3.9 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer	55
5.3.10 Transiente Transfektion von Zellen	56
5.3.11 Ernten von Zellen	57
5.3.12 Oil Red O-Färbung	57

5.4 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden	58
5.4.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Proteinanalyse	58
5.4.2 Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten zur Proteinanalyse	58
5.4.3 Proteinquantifikation nach Bradford	59
5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
5.4.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	61
5.4.6 Western Blot Analyse	61
5.4.7 Anfärbung von phosphorylierten Proteinen	61
5.4.8 Proteinfärbung mit Ponceau S	62
5.4.9 Immunologischer Proteinnachweis	62
5.4.10 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	63
5.4.11 Streptavidin-basierte Affinitätsreinigung von DNA-bindenden Proteinen ("pull-down")	64
5.4.12 <i>In vitro</i> -CK2 Kinaseaktivitäts-Assay	65
5.4.13 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	65
5.4.14 TUNEL-Assay	67
5.4.15 MTT-Assay	68
5.4.16 Luciferase-Assay	68
6. ERGEBNISSE	70
6.1 CK2 und neurale Differenzierung	70
6.1.1 Vorstellung des Differenzierungssystems	71
6.1.2 Untersuchungen zur CK2-Hemmung mit CX-4945 und Quinalizarin	73
6.1.2.1 Bestimmung der CK2-Aktivität nach Hemmung	73
6.1.2.2 Bestimmung der CK2-Expression nach Hemmung	75
6.1.3 Einfluss der CK2 auf die neuronale und gliale Differenzierung	76
6.1.3.1 Mikroskopische Analyse mittels Immunfluoreszenz	76
6.1.3.2 Analyse auf Proteinebene	78
6.1.4 Einfluss der CK2 auf die Stammzellpopulation	80
6.1.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose nach CK2-Hemmung	82
6.2 CK2 und Adipogenese - Ergebnisse in hMSC	85
6.2.1 Vorstellung des Differenzierungssystems	85
6.2.2 Untersuchungen zur CK2 während der Differenzierung	87
6.2.2.1 Die Expression der CK2	87

6.2.2.2 Die Aktivität der CK2	88
6.2.2.3 Die subzelluläre Lokalisation der CK2	89
6.2.3 Ermittlung der optimalen Hemmstoffkonzentration in proliferierenden hMSC	92
6.2.4 Untersuchungen zur Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Differenzierung	94
6.2.4.1 Analyse des Differenzierungsstatus	94
6.2.4.2 Bestimmung der Zellvitalität und CK2-Aktivität	96
6.2.4.3 Nachweis von PPAR γ 2 in der Immunfluoreszenz	98
6.3 CK2 und Adipogenese - Ergebnisse in der Zelllinie 3T3-L1	101
6.3.1 Vorstellung des Differenzierungssystems	101
6.3.2 Untersuchungen zur CK2 während der Differenzierung	102
6.3.2.1 Die mRNA Expression der CK2	102
6.3.2.2 Die subzelluläre Lokalisation der CK2	103
6.3.2.3 Die Expression der CK2 in Cytoplasma- und Zellkern-Extrakten	105
6.3.3 Untersuchungen zur Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Differenzierung	107
6.3.3.1 Bestimmung und Überprüfung der Inhibitorkonzentration	107
6.3.3.2 Eingrenzung des CK2-Zeitfensters	109
6.3.3.3 Analyse der Proliferation während der MCE	110
6.3.3.4 Nachweis von PPAR γ , C/EBP α und SREBP-1	111
6.3.4 Charakterisierung von C/EBP δ als CK2-Substrat in HCT116 Zellen	114
6.3.4.1 Analyse der CK2-Phosphorylierung von C/EBP δ	115
6.3.4.2 Analyse der Interaktion von C/EBP δ und CK2	117
6.3.4.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von C/EBP δ	118
6.3.4.4 Analyse der Transaktivierungsfähigkeit von C/EBP δ	119
6.3.5 Analyse des dem PPAR γ 2 vorgeschalteten Signalweges in 3T3-L1 Zellen	122
6.3.5.1 Bestimmung des mRNA-Gehalts von C/EBP β und C/EBP δ	123
6.3.5.2 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ	124
6.3.5.3 Bestimmung der DNA-Bindung von C/EBP β und C/EBP δ	127
6.3.5.4 Bestimmung der Aktivität des PPAR γ 2 Promotors	129
6.3.5.5 Bestimmung des Gehalts der für PPAR γ 2 spezifischen miRNAs	131
7. DISKUSSION	134
8. LITERATURVERZEICHNIS	150
9. PUBLIKATIONEN	169
DANKSAGUNG	170

1. Zusammenfassung

Unter dem Begriff Differenzierung versteht man die Bildung spezialisierter Zellen und Gewebe aus vormalig gleichartigen Zellen, den Stammzellen. Die Differenzierung wird durch spezifische Signalkaskaden reguliert und geht meistens mit einer Veränderung des Phänotyps und der Funktion, sowie des Verlusts der Teilungsfähigkeit einher. Ein Enzym, dem dabei eine bedeutende Rolle zukommt, ist die Proteinkinase CK2, eine Serin-/Threonin-Kinase, bestehend aus den katalytischen Untereinheiten CK2 α und/oder α' und der regulatorischen Untereinheit CK2 β . Sie ist für die embryonale Entwicklung essentiell und unterliegt, abhängig vom Entwicklungsstadium, einer strengen gewebsspezifischen Regulation. Der CK2 wurden bereits bei mehreren Differenzierungsprozessen wichtige Rollen zugeschrieben, darunter die Adipogenese, Osteogenese und Myogenese.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der CK2 für die neurale und adipogene Differenzierung in primären Stammzellen untersucht und die Funktion der CK2 während der Adipogenese in der Zelllinie 3T3-L1 näher spezifiziert.

Die Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung erfolgten in neuronalen Stammzellen der Maus. Die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit den spezifischen Inhibitoren Quinalizarin und CX-4945 beeinflusste sowohl die Differenzierung zu Astrozyten als auch die zu Neuronen. CX-4945 reduzierte die Differenzierung zu Astrozyten und erhöhte die Differenzierung zu Neuronen abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe. Zudem zeigten die inhibierten Zellen eine verstärkte Nestin-Expression, was allgemein für eine verringerte Differenzierung spricht. Quinalizarin reduzierte die Differenzierung zu beiden Zelltypen, wobei eine Hemmung von Beginn der Differenzierung an Apoptose auslöste, was sich vor allem auf die Stammzellen und die Differenzierung zu Neuronen auswirkte.

Die Untersuchung der CK2 während der Adipogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigte ein unterschiedliches Verhalten der CK2-Untereinheiten. Die Expression von CK2 α , sowie die CK2-Aktivität nahmen im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich ab, während die Menge an CK2 β fluktuierte. Die Analyse der subzellulären Lokalisation ergab eine vorwiegende Kernlokalisation von CK2 α , wohingegen CK2 β im Verlauf der Differenzierung ein deutliches "shuttling" zeigte. Die Hemmung der CK2 mit Quinalizarin bewirkte ein Ausbleiben der Differenzierung, während CX-4945 die Differenzierung nicht unterdrückte. Die Bestimmung der CK2-Aktivität deckte auf, dass CX-4945 in den differenzierenden hMSC nicht in der Lage war, die CK2-Aktivität effektiv zu hemmen. Die Analyse des für eine erfolgreiche Adipogenese essentiellen

Transkriptionsfaktors PPAR γ 2 zeigte, dass nicht dessen fehlende Expression die Ursache für das Ausbleiben der Differenzierung ist, sondern eine cytoplasmatische Lokalisation von PPAR γ 2, wodurch dieses seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben kann.

Im zweiten Adipogenese-Zellsystem, den 3T3-L1 Zellen, konnten Abweichungen der CK2-Transkription, sowie ihrer Expression im Cytoplasma und im Zellkern zu den im Gesamtzellextrakt erhaltenen Ergebnissen festgestellt werden. Unabhängig davon, konnte die für Quinalizarin beobachtete Hemmung der Adipogenese mit einem zweiten Inhibitor, nämlich CX-4945, bestätigt werden. Die Zugabe der Inhibitoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung ermöglichte die Eingrenzung des CK2-Einflusses auf die ersten 48-72 h der Differenzierung. Das Ausbleiben der Adipogenese konnte auf die fehlende Expression der essentiellen Transkriptionsfaktoren PPAR γ 2 und C/EBP α zurückgeführt werden. Die Charakterisierung von C/EBP δ in HCT116 Zellen, das zusammen mit C/EBP β die Transkription von PPAR γ 2 und C/EBP α induziert, zeigte, dass dieses *in vivo* ein Substrat und Bindungspartner der CK2 ist. Die subzelluläre Lokalisation von C/EBP δ änderte sich nach Hemmung nicht, jedoch konnte eine positive Wirkung der Phosphorylierung auf die Transaktivierungsfähigkeit des C/EBP δ nachgewiesen werden. Auch in den 3T3-L1 Zellen kam es nach Hemmung nicht zur Änderung der subzellulären Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ . Genauso wenig beeinflusste die Hemmung der CK2 deren mRNA-Profil oder ihre Bindefähigkeit an die PPAR γ 2-Promotor-DNA. Der PPAR γ 2-Promotor zeigte jedoch überraschenderweise in den gehemmten Zellen eine erhöhte Transaktivierungsrate, was der beobachteten fehlenden Proteinexpression widersprach, und C/EBP δ als verantwortlichen Faktor ausschloss. Daraufhin wurde die Expression einiger für PPAR γ 2 beschriebenen miRNAs untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass in den inhibierten Zellen die Expression aller untersuchten miRNAs erhöht war. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die stark reduzierte Expression von PPAR γ 2 sein.

Die Rolle der CK2 in der Zelle ist sehr komplex und durch die Vielzahl an Substraten auch nicht auf einen bestimmten Angriffspunkt einzugrenzen. Die hier nachgewiesene Beteiligung an zwei Differenzierungsprozessen und Berichte über eine Rolle in anderen Differenzierungssystemen lassen darauf schließen, dass sie auch noch im Erwachsenenalter wichtig für die Neuentstehung oder Regeneration von Geweben ist.

2. Summary

The concept of differentiation describes the development of specialized cells and tissues from former homogenous cells, the stem cells. The differentiation is regulated through specific signaling cascades and usually goes hand in hand with a change in morphology and function as well as the loss of proliferation. A very important enzyme in this process is protein kinase CK2, which is a serine/threonine kinase consisting of the catalytic CK2 α and/or α' subunits and the regulatory CK2 β subunit. It is crucial for embryonic development and is strongly and tissue-specifically regulated depending on the developmental stage. Important roles in several differentiation processes, such as adipogenesis, osteogenesis and myogenesis, have already been attributed to CK2.

In the present thesis the role of CK2 for neural and adipogenic differentiation was examined in primary stem cells and the function of CK2 during adipogenesis was specified in greater detail using the cell line 3T3-L1.

The investigations concerning the neural differentiation were performed in neural stem cells isolated from mice. The inhibition of the CK2 kinase activity using the specific inhibitors quinalizarin and CX-4945 affected astrocytic as well as neuronal differentiation. CX-4945 reduced the differentiation to astrocytes and increased the differentiation to neurons depending on the time of treatment. Moreover, the inhibited cells showed an increased nestin expression, which in general indicates a diminished differentiation. Quinalizarin reduced the differentiation to both cell types, where inhibition from the beginning of differentiation onwards induced apoptosis, which mainly affected the stem cells and the neuronal differentiation.

Analysis of CK2 during adipogenesis in human mesenchymal stem cells (hMSC) revealed an individual behavior of the CK2 subunits. The expression of CK2 α , as well as the CK2 activity constantly decreased during the differentiation, whereas the amount of CK2 β fluctuated. The analysis of the subcellular localization demonstrated a predominant nuclear localization of CK2 α , whereas CK2 β showed a distinct shuttling during the differentiation process. Inhibition of CK2 with quinalizarin inhibited the differentiation, whereas CX-4945 did not. The measurement of the CK2 activity revealed, that CX-4945 was unable to reduce the activity efficiently in differentiating hMSC. Analysis of PPAR γ 2, a transcription factor essential for proper adipogenesis, showed, that not the missing expression was the cause of the absence of differentiation, but a cytoplasmic localization of PPAR γ 2, which disabled PPAR γ 2 to act as a transcription factor.

In the second adipogenesis model, the 3T3-L1 cells, some alterations concerning the transcription of CK2 as well as its expression in the cytoplasm and nucleus during differentiation were detected in comparison to results obtained in whole cell extracts. However, the inhibition of adipogenesis observed with quinalizarin was confirmed with another inhibitor: CX-4945. By adding the inhibitors at different time points during the differentiation process, the influence of CK2 could be narrowed down to the first 48-72 h of the differentiation. The lack of adipogenesis could be ascribed to the missing expression of the important regulators PPAR γ 2 and C/EBP α . The characterisation of C/EBP δ in HCT116 cells, which, together with C/EBP β , activates the transcription of PPAR γ 2 and C/EBP α , showed that C/EBP δ is a substrate and binding partner of CK2 *in vivo*. The subcellular localization of C/EBP δ did not change after inhibition of CK2, but there was a positive effect of the phosphorylation on the transactivation activity of C/EBP δ . In 3T3-L1 cells there was also no change in the subcellular localization of C/EBP β and C/EBP δ after inhibition of CK2. Nor did inhibition of CK2 influence their mRNA profile or their DNA binding ability to the PPAR γ 2 promoter. Surprisingly, the PPAR γ 2 promoter showed an increased transactivation rate in inhibited cells, which contradicted the observed lacking protein expression, and excluded C/EBP δ as the responsible factor. Subsequently, the analysis of four miRNAs described for PPAR γ 2 revealed, that the expression of all analysed miRNAs was elevated in the inhibited cells. This result might be an explanation for the strongly reduced expression of PPAR γ 2.

The role of CK2 in the cell is very complex and due to the amount of substrates cannot be narrowed down to one specific mode of action. Here, a contribution of CK2 to two differentiation systems could be shown and together with the reports about its role in several other systems one can conclude, that CK2 is important for redevelopment and regeneration of tissues even in the adult.

3. Einleitung

3.1 Entwicklung und Differenzierung

Die Entstehung eines kompletten Organismus aus einer einzelnen Zelle, der Zygote, erfordert das Zusammenspiel vieler verschiedener Prozesse. Dazu gehören die Zellteilung, die Musterbildung, die Änderung der Zellform, die Differenzierung und das Zellwachstum. Nach der Befruchtung teilt sich die Zygote mehrere Male ohne an Zellmasse zu gewinnen, was man als Furchung bezeichnet. So erreicht sie das Stadium der Blastozyste, die sich durch eine innere und eine äußere Zellmasse kennzeichnet. Die äußere Zellmasse entwickelt sich zur Plazenta und anderen Stützgeweben, wohingegen sich die innere Zellmasse zum Embryo entwickelt. Schon früh während der Embryogenese, teilen sich die Zellen in die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm (Gastrulation), die wiederum den Ausgangspunkt zur Bildung verschiedener Gewebe darstellen. Das Entoderm entwickelt sich zu den inneren Organen wie Magen-Darmtrakt, Leber und Lunge, aus dem Mesoderm entsteht das Skelett (Knochen und Knorpel), die Muskeln, das Binde- und Stützgewebe (Sehnen, Fett, u.a.) sowie Niere, Herz und die zellulären Bestandteile des Blutes. Das Ektoderm entwickelt sich zu Haut, Nervensystem und den Sinnesorganen (Abb. 1).

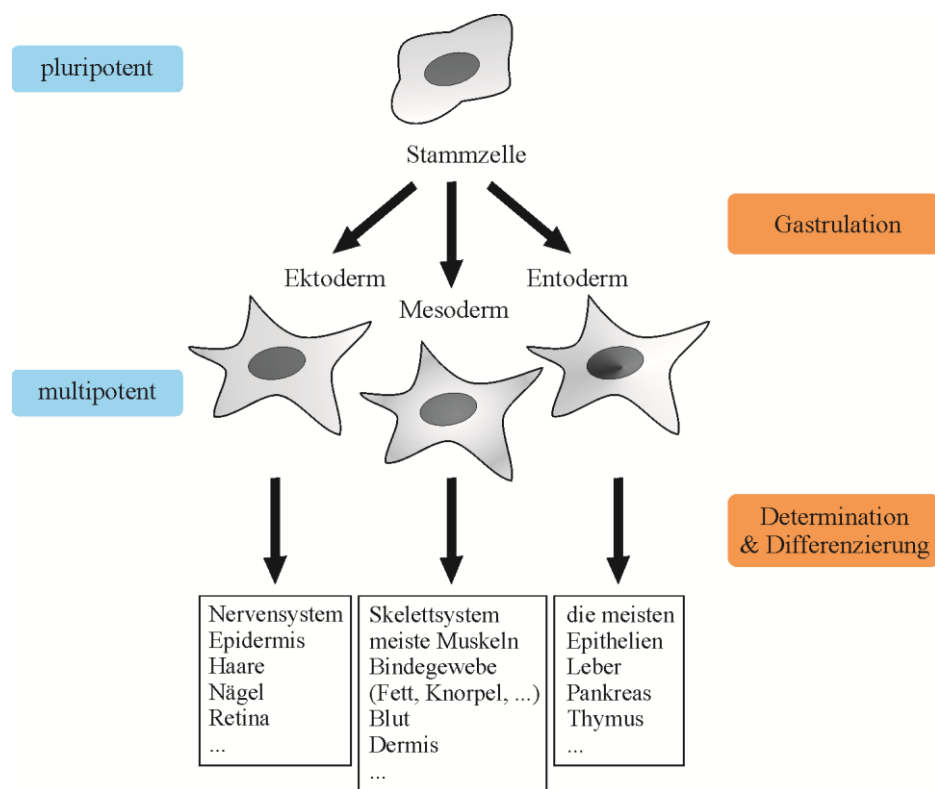


Abbildung 1: Übersicht über die Entwicklung der Gewebe aus den pluripotenten Stammzellen. Die pluripotenten Stammzellen der Blastozyste entwickeln sich im Zuge der Gastrulation zu den drei Keimblättern Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Aus den multipotenten Stammzellen der Keimblätter gehen im Anschluss durch Determinierung und Differenzierung die einzelnen Gewebe hervor.

Zur Bildung all dieser Gewebe müssen sich die multipotenten Stammzellen der Keimblätter weiter spezialisieren, was man als Differenzierung bezeichnet. Die Differenzierung einer Zelle ist gekennzeichnet durch den Verlust des Potentials mehrere Zelltypen auszubilden und die Determinierung zu einem bestimmten Zelltyp mit speziellen Eigenschaften hin. Beim Menschen unterscheidet man mindestens 250 verschiedene Zelltypen, die alle aus einer einzelnen Zygote hervorgegangen sind [1]. Zwei dieser Differenzierungsprozesse - die neurale und die adipogene Differenzierung - werden nun genauer vorgestellt.

3.1.1 Die neurale Differenzierung

Früher ging man davon aus, dass nach der Gehirnentwicklung während der embryonalen und postnatalen Phase im Erwachsenen keine signifikante neurale Differenzierung, also die Entstehung von Neuronen und Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) mehr möglich sei. Seit der Entdeckung von neuronalen Stammzellen (NSC) in bestimmten Regionen des adulten Gehirns wird intensiv an ihnen geforscht, um die Möglichkeiten und Grenzen dieser Stammzellen zu erkennen. NSC zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und der Differenzierung in die drei Zelltypen Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten aus. Adulte NSC sind hauptsächlich in zwei Regionen zu finden: in der subgranulären Schicht des *Gyrus dentatus* im Hippocampus [2] und in der Subventrikularzone (SVZ) der lateralen Ventrikel [3]. Ihre Hauptaufgabe ist die Neubildung von Neuronen (Neurogenese). Der *Gyrus dentatus* ist an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt [4, 5] und spielt auch eine Rolle bei der Verarbeitung von Stress und bei Depressionen [6, 7]. Die adulten Stammzellen aus der SVZ generieren kontinuierlich Neurone, die über eine relativ weite Strecke migrieren müssen, um zu ihrem Bestimmungsort, dem Riechkolben (*Bulbus olfactorius*), zu gelangen [8, 9]. Abb. 2 gibt einen Überblick über die Gehirnentwicklung der Maus im Bereich der lateralen Ventrikel. Wenn das zentrale Nervensystem beginnt sich zu entwickeln, besteht es aus einer Schicht neuraler Stammzellen, Neuroepithel genannt (Abb. 2a, blau). Die NSC teilen sich zunächst symmetrisch, um ihre Zahl zu vergrößern. Es entstehen nur vereinzelt frühe Neurone. Während der weiteren Entwicklung verändern sich die NSC zu radialen Gliazellen (RG), die jedoch noch Stammzellcharakter besitzen (Abb. 2b, blau) [10]. Die RG teilen sich

nun asymmetrisch; es entsteht zusätzlich zu einer Stammzelle auch eine Tochterzelle, die eine Zwischenstufe zwischen Stammzelle und ausdifferenzierter Zelle einnimmt [11]. Diese Zellen werden Progenitorzellen genannt und bilden die SVZ (Abb. 2b, grün). Man unterscheidet neuronale und oligodendrozytäre Progenitorzellen. Die entstehenden Neurone nutzen die langen Fortsätze der RG zur Migration (Abb. 2b, rot). Zusätzlich dazu können Neurone auch direkt aus RG in der Ventrikularzone (VZ) entstehen [12]. Nach der Geburt (Abb. 2c) differenzieren die RG außer zu Neuronen und Oligodendrozyten auch ohne die Zwischenstufe der Progenitorzellen zu Ependymzellen und Astrozyten. Im adulten Tier (Abb. 2d) bilden die entstehenden Ependymzellen (braun) eine epitheliale Barriere zum lateralen Ventrikel. Die Stammzellen, die sich aus den RG entwickelt haben, besitzen nun astrozytäre Merkmale und werden als B-Zellen bezeichnet (Abb. 2d, blau). Sie teilen sich bei der Mitose asymmetrisch in eine B-Zelle und eine Progenitorzelle (C-Zelle, Abb. 2d, grün). Aus der C-Zelle entwickeln sich dann bei der Mitose symmetrisch entweder zwei C-Zellen oder zwei Neuroblasten (A-Zellen, Abb. 2d, rot), die auf dem Weg zum *Bulbus olfactorius* zu reifen Neuronen differenzieren [13-15].

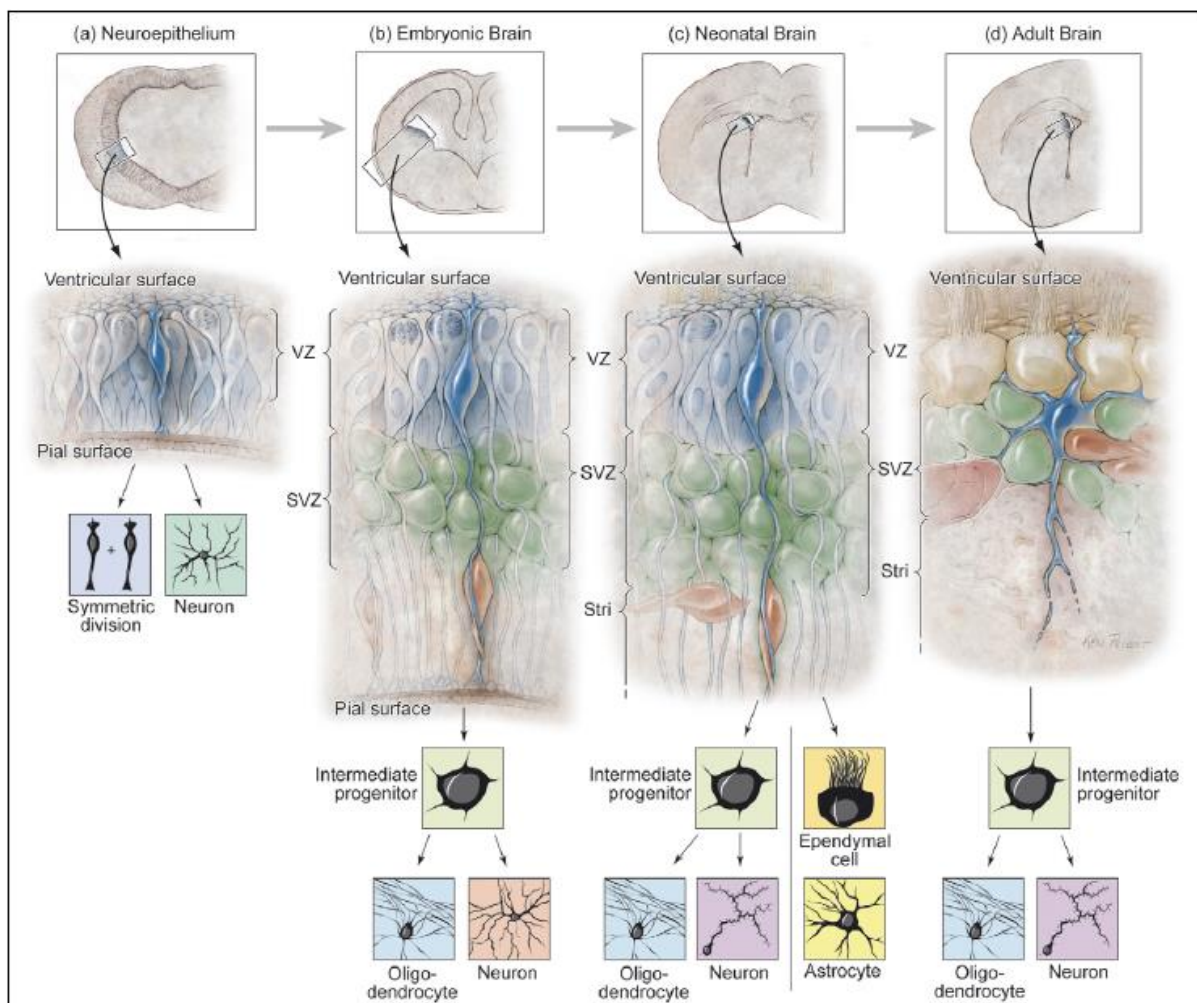


Abbildung 2: Schematische Darstellung der murinen Gehirnentwicklung im Bereich der lateralen Ventrikel. Oben ist jeweils ein Querschnitt durch das Vorderhirn zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten abgebildet. In der Mitte ist der markierte Ausschnitt vergrößert dargestellt. Die NSC (in blau) teilen sich zu Beginn der Gehirnentwicklung (a) nur symmetrisch und generieren kaum Neurone. Während der weiteren Entwicklung (b) entstehen aus ihnen Progenitorzellen (in grün), die sich zu Oligodendrozyten oder über Neuroblasten (in rot) zu Neuronen weiterentwickeln. Nach der Geburt (c) entstehen zusätzlich dazu die Ependymzellen und Astrozyten. Im adulten Gehirn (d) bilden die Ependymzellen eine epitheliale Abgrenzung zum lateralen Ventrikel. Die NSC, die nun astrozytäre Merkmale aufweisen, können sich immer noch über Progenitorzellen zu Oligodendrozyten oder Neuroblasten entwickeln. Stri – Striatum, SVZ – Subventrikularzone, VZ – Ventrikularzone. Die Abbildung stammt aus [16].

Die genauen Mechanismen der Differenzierung zu den einzelnen Zelltypen sind noch nicht komplett aufgeklärt. Wichtig ist jedoch die jeweilige Mikroumgebung, die sowohl die Proliferation der NSC als auch die Differenzierung beeinflusst. So steigern die beiden Wachstumsfaktoren epidermal growth factor (EGF) und fibroblast growth factor 2 (FGF-2) die Proliferation und die Neurogenese (nur FGF-2) der NSC [17]. Neurotrophine wie der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) spielen bei der neuronalen Differenzierung ebenfalls eine Rolle [18, 19]. Wichtig dafür sind auch die Notch- und β -Catenin-Signalwege, wobei Notch die Neurogenese inhibiert und β -Catenin sie fördert. Ahmed *et al.* geben einen Überblick über die bisher identifizierten, an der Differenzierung beteiligten Transkriptionsfaktoren, wobei es keine eindeutige Signalkaskade zu geben scheint [20].

Auch die Differenzierung von neuralen Stammzellen kann experimentell untersucht werden. Dazu werden die Zellen aus den oben beschriebenen Regionen isoliert und in geeigneten Medien kultiviert. In Kultur wachsen die Zellen als nicht-adhärenente Zellkugeln, die Neurosphären genannt werden [21]. Sie bestehen hauptsächlich aus neuralen Stammzellen (Typ B), beinhalten jedoch auch schon eine geringe Anzahl an weiterentwickelten Zellen (Typ C und A). Die Differenzierung kann durch Wachstumsfaktorentzug und die Gabe von Retinsäure alleine oder in Kombination mit extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin eingeleitet werden. Differenzierte Gliazellen und Neurone exprimieren spezielle Markerproteine, an denen man sie erkennen kann (zusammengefasst in [22]). Viele davon gehören zu den Intermediärfilamenten, wie z.B. das β III-Tubulin der Neurone, das glial fibrillary acidic protein (GFAP) der Astrozyten oder das Nestin als Marker der neuralen Stammzellen. Ein Marker für Oligodendrozyten ist Olig-2, ein Transkriptionsfaktor.

3.1.2 Die Adipogenese

Die Menge an Fettgewebe eines Menschen richtet sich nach Größe und Anzahl der Fettzellen (Adipozyten). Ist die Energiezufuhr dauerhaft größer als der Verbrauch werden die bereits vorhandenen Fettzellen gefüllt und ab einem gewissen Füllgrad auch neue Fettzellen gebildet. Diese entstehen aus mesenchymalen Stammzellen des Stromas oder Knochenmarks, die sich durch äußere Signale zuerst zu Präadipozyten umwandeln (Determination) und anschließend zu Adipozyten differenzieren (Adipogenese) [23]. Eine Übersicht zur Entstehung eines reifen Adipozyts aus einer mesenchymalen Stammzelle ist in Abb. 3 dargestellt.

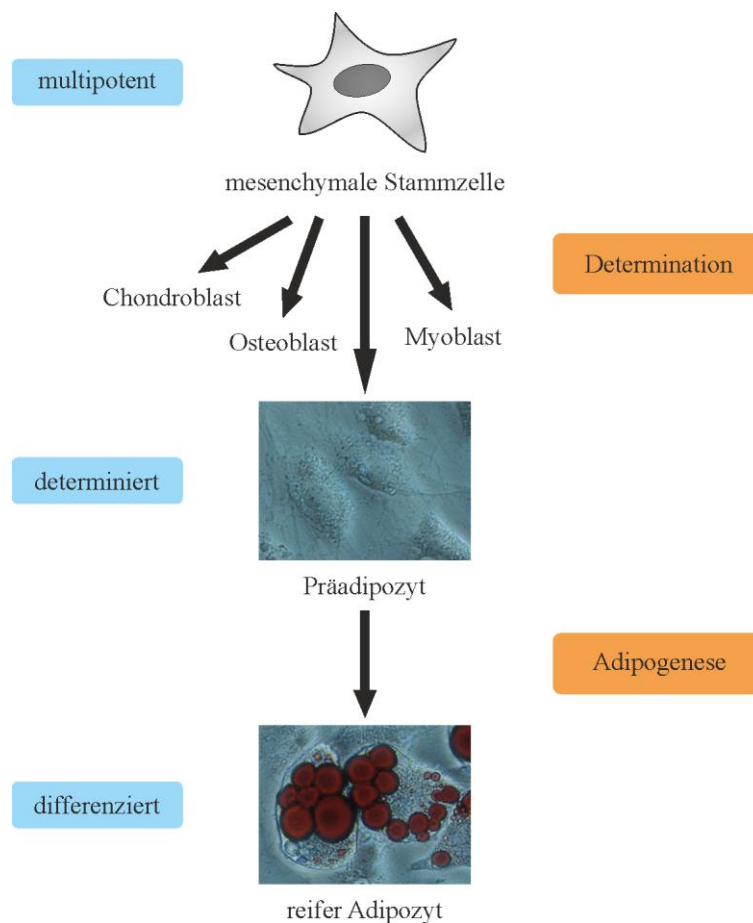


Abbildung 3: Übersicht über die Entwicklung einer mesenchymalen Stammzelle zum reifen Adipozyt. Die multipotenten mesenchymalen Stammzellen können sich zu Chondroblasten, Osteoblasten, Präadipozyten oder Myoblasten weiterentwickeln, was man als Determination bezeichnet. Präadipozyten differenzieren im Zuge der Adipogenese zu reifen Adipozyten. Die Lipidtröpfchen der reifen Adipozyten wurden mit Oil Red O rot angefärbt. Vergrößerung: 800x.

Im Gegensatz zur Determination sind die molekularen Vorgänge der Adipogenese gut verstanden, da sie in bereits determinierten Präadipozytenzelllinien *in vitro* untersucht werden können. Als Modellsysteme haben sich murine Zelllinien, wie "Swiss" 3T3-L1 und 3T3-

F442A, etabliert. Diese stammen ursprünglich aus 17-19 Tage alten Embryonen des "Swiss"-Mausstamms, deren Zellen in Kultur genommen und anschließend durch Inokulation zu eigenen Zelllinien mit fettakkumulierenden Eigenschaften herangezogen wurden [24, 25]. Die 3T3-L1 Zellen zeichnen sich während der Proliferation durch Eigenschaften einer Fibroblasten-Linie, wie Kollagensynthese, aus, während sie nach Erreichen der Konfluenz durch chemische Stimulanzen zu reifen Adipozyten differenzieren [26]. Zusätzlich zu den bekannten Zelllinien können auch primäre humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) aus menschlichen Geweben isoliert und in Kultur differenziert werden. Da sie noch nicht determiniert sind, besitzen sie nicht nur ein adipogenes Differenzierungspotential, sondern können sich auch zu anderen mesenchymalen Zelltypen wie Chondrozyten, Osteoblasten oder Myoblasten entwickeln [27]. Allen Systemen gemeinsam ist, dass die Zellen vor der Differenzierung konfluent und somit in der G₀/G₁-Phase wachstumsarretiert sein müssen, um den adipogenen Phänotyp ausbilden zu können. Je nach Zellsystem durchlaufen die ruhenden Zellen nach Stimulierung der Differenzierung ein bis zwei synchrone Zellteilungen, mitotische klonale Expansion (MCE, mitotic clonal expansion) genannt, bevor die Proliferation vollends eingestellt wird und die terminale Differenzierung beginnt. Ob die MCE essentiell für die Differenzierung ist, wird kontrovers diskutiert. Die Untersuchungen dazu greifen alle auf eine Hemmung des Wiedereintritts in den Zellzyklus zurück. Die Auswirkungen auf die Differenzierung jedoch, scheinen sowohl zelltypspezifisch als auch abhängig vom Angriffspunkt zu sein [28]. Zumindest für die Zelllinie 3T3-L1 gilt die MCE jedoch als essentiell [29].

Am Prozess der Adipogenese sind viele Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die beiden wichtigsten Vertreter sind die CCAAT/Enhancer-Bindeproteine (C/EBPs) und der Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptor γ (PPAR γ). Die Familie der C/EBPs umfasst sechs Mitglieder: C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , sowie ζ , letzteres besser bekannt als C/EBP-homologes Protein (CHOP). Strukturell besitzen sie am N-Terminus eine oder mehrere Aktivierungsdomänen (außer γ und CHOP) und am C-Terminus eine basische Leucin-Zipper Domäne (bZIP), bestehend aus einer basischen DNA-Bindedomäne (unvollständig bei CHOP), direkt gefolgt von einer Leucin-Zipper Domäne, die der Dimerisierung dient. Die bZIP-Region ist sowohl zwischen den einzelnen Mitgliedern als auch evolutionär hoch konserviert. Eine Dimerisierung ist in der Regel mit sich selbst als Homodimer, mit anderen Mitgliedern der C/EBP-Familie als Heterodimer oder sogar mit Mitgliedern anderer bZIP-Transkriptionsfaktorfamilien, wie z.B. der CREB/ATF-Familie, möglich [30, 31]. Durch die Dimerisierung erhöht sich ihre Stabilität und die Affinität, an die DNA zu binden und somit auch ihre

transkriptionelle Aktivität [32, 33]. Durch die unvollständige DNA-Bindedomäne von CHOP ist es CHOP-haltigen Heterodimeren nicht möglich, an die C/EBP-Binderegionen der DNA zu binden; CHOP fungiert somit als negativer Regulator für die anderen Familienmitglieder [34]. Vier C/EBPs, nämlich C/EBP α , β , δ und CHOP, spielen für die Adipogenese eine wichtige Rolle. PPAR γ ist der Masterregulator der Adipogenese und des Adipozyten-metabolismus, d.h. ohne PPAR γ findet keine Differenzierung statt [35, 36]. Er ist ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptorsuperfamilie. Die Bindung eines Liganden (freie Fettsäuren, Eicosanoide, Pharmaka) führt zur Konformationsänderung des PPAR γ s, was die Bindung an einen weiteren nukleären Rezeptor, den Retinoid-X-Rezeptor (RXR), ermöglicht. Durch die Bindung erlangen die beiden Rezeptoren ihre Transkriptionsfaktorfunktion und können die Expression von Zielgenen induzieren. Von PPAR γ gibt es zwei (Maus) bzw. drei (Mensch) Isoformen PPAR γ 1-3, wobei für die Adipogenese hauptsächlich Isoform 2 wichtig ist [37].

Der Chemikalienmix, der im Zellkulturmodell die Differenzierung einleitet, besteht aus 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Dexamethason und Insulin. IBMX erhöht durch die Hemmung der Phosphodiesterase den Spiegel an zyklischem Adenosylmonophosphat (cAMP) in der Zelle. Dies führt zusammen mit Insulin innerhalb von fünf Minuten zur Phosphorylierung des cAMP regulatory element binding protein-1 (CREB-1) an Serin 133 [38], was den Start der Adipogenese-Signalkaskade darstellt (siehe Abb. 4). Die Phosphorylierung von CREB-1 führt zur Bildung von C/EBP β [39], welches, um als Transkriptionsfaktor aktiv zu werden, im Anschluss von der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Glykogensynthase-Kinase3 β (GSK3 β) phosphoryliert werden muss. Diese Phosphorylierungen an Threonin 188 (MAPK) und Serin 184 sowie Threonin 179 (GSK3 β) sind für die vollständige DNA-Bindung von C/EBP β essentiell [40] und können nur ausgeführt werden wenn parallel die Menge des Gegenspielers Proteinphosphatase 2A (PP-2A) reduziert wird [41, 42]. Der negative Regulator CHOP, der C/EBP β immer noch im inaktiven Zustand hält, wird am G₁/S Übergang der MCE degradiert und gibt C/EBP β frei [43]. Das durch das Dexamethason induzierte C/EBP δ tritt an seine Stelle und induziert als Heterodimer mit C/EBP β die Transkription von PPAR γ 2 und C/EBP α , die sich im Anschluss gegenseitig in ihrer Expression stimulieren [44]. Zwischen der Bildung des Heterodimers C/EBP β /C/EBP δ (~16-24 h nach Differenzierungsbeginn) und der Expression von PPAR γ 2 und C/EBP α (~48-72 h nach Differenzierungsbeginn) liegt eine relativ lange Zeitspanne, die auch als Verzögerungsphase (lag phase) bezeichnet wird. Grund dafür ist wahrscheinlich die Induktion der Methyltransferase G9a durch C/EBP β während der MCE, die die Promotoren von C/EBP α und PPAR γ 2 durch Methylierung an Histon H3 Lysin 9 (H3K9) inhibiert [45,

46]. Da C/EBP α antimitotisch wirkt und PPAR γ 2 es induziert, dürfen beide erst exprimiert werden wenn die MCE abgeschlossen ist [47, 48]. C/EBP α und PPAR γ 2 wirken gemeinsam an der Induktion von Adipozyten-spezifischen Genen, wie der Lipoproteinlipase, dem adipocyte-type fatty acid-binding protein (aP2) oder Hormonen wie Adiponektin und Leptin und führen damit zum Phänotyp des lipidgefüllten, reifen Adipozyts [49].

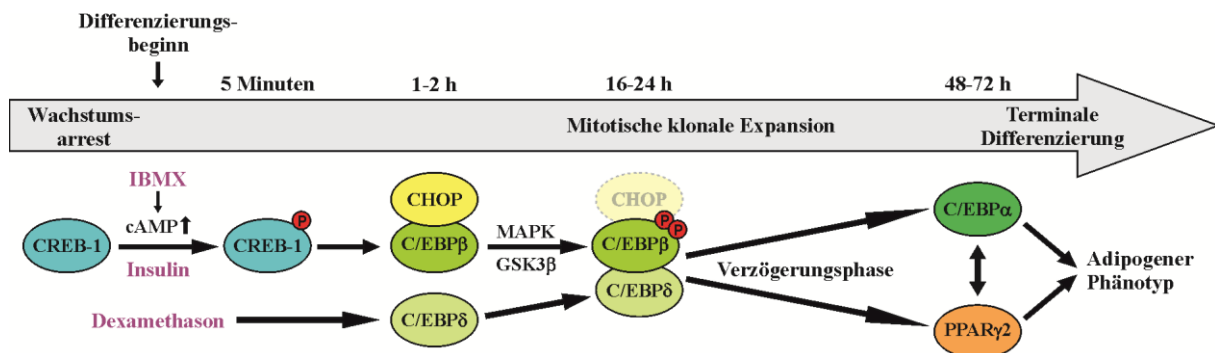


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signalkaskade während der Adipogenese mit zeitlicher Eingrenzung. Nach Erreichen des Wachstumsarrests wird die Differenzierung mit IBMX, Insulin und Dexamethason eingeleitet. Unter dem Einfluss von IBMX und Insulin wird CREB-1 innerhalb von fünf Minuten phosphoryliert und induziert die Bildung von C/EBP β , welches mit CHOP zunächst inaktive Dimere bildet. C/EBP β wird von MAPK und GSK3 β phosphoryliert, wodurch es seine vollständige DNA-Bindefähigkeit erhält. Durch die Degradation von CHOP kann C/EBP β Dimere mit C/EBP δ ausbilden, welches früh von Dexamethason induziert wird. Nach der Verzögerungsphase bewirken C/EBP β und C/EBP δ die Bildung von C/EBP α und PPAR γ 2, die sich dann gegenseitig regulieren. Die beiden letztgenannten Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die terminale Differenzierung und die Ausbildung des adipogenen Phänotyps.

Über die letzten beiden Jahrzehnte ist eine Gruppe kleiner nicht-kodierender RNA-Moleküle in den Fokus der Recherche gerückt: die microRNAs (miRNAs). Bei miRNAs handelt es sich um 20-24 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die meist an der 3'- oder seltener der 5'-untranslatierten Region (UTR) von Boten-RNAs (mRNAs) binden und zu ihrer Degradation führen oder ihre Translation hemmen [50]. Somit regulieren sie die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. In Untersuchungen an Tiermodellen wurden bereits viele miRNAs nachgewiesen, die eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung, sowie bei den damit zusammenhängenden Erkrankungen spielen [51, 52]. Auch bei den verschiedenen Stadien der Adipogenese greifen zahlreiche miRNAs regulatorisch ein, entweder direkt über die Regulation der Expression von Schlüsselproteinen oder indirekt über vor- oder nachgeschaltete Signalwege. Es existieren sowohl miRNAs mit proadipogenen, als auch welche mit antiadipogenen Eigenschaften (zusammengefasst in [53]).

3.2 Die Proteinkinase CK2 und Differenzierung

Die Proteinkinase CK2 wurde als erste nachweisbare Kinase 1954 von Burnett und Kennedy entdeckt [54]. Der ursprüngliche Name "Casein Kinase 2" wurde in den 1990er Jahren jedoch zu Proteinkinase CK2 geändert, da man feststellte, dass das damals verwendete und namensgebende Casein kein physiologisches Substrat darstellt. Die CK2 ist eine Serin/Threonin Kinase, die ubiquitär vorkommt und unter Eukaryonten sowohl strukturell als auch funktionell hoch konserviert ist [55-59]. Man unterscheidet die beiden katalytischen Untereinheiten CK2 α und α' von der regulatorischen Untereinheit CK2 β . Die einzelnen Untereinheiten können als Monomere (CK2 α , α') bzw. als Dimer (CK2 β)₂ eigene Funktionen ausüben [60-64]. Die größte Bedeutung kommt jedoch dem Holoenzym, bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten, zu. Die katalytischen Untereinheiten im Heterotetramer sind beliebig kombinierbar; als Kombinationen können also $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$ oder $\alpha'\beta_2$ vorkommen. Die katalytischen Untereinheiten müssen dabei über das bereits vorhandene β -Dimer zum Holoenzym assemblieren, da sie keine Bindung untereinander ausbilden können [65]. CK2 β trägt neben der Stabilisierung des Holoenzym auch zu dessen katalytischer Aktivität, sowie zur Regulation der Substratspezifität bei [66, 67]. CK2 α und α' werden von zwei verschiedenen Genen kodiert und weisen in ihrer katalytischen Region (Aminosäuren 1-330) eine etwa 90%ige Homologie auf. Anhand der Struktur ihres katalytischen Zentrums ordnet man sie der Familie der CMGC-Kinasen zu [68]. In ihren C-Termini sind CK2 α und α' jedoch komplett verschieden, CK2 α' ist zudem um 41 Aminosäuren verkürzt [69]. CK2 α und α' weisen in vielen Bereichen eine gewisse Redundanz auf; es wurden aber auch bereits Funktionen beschrieben, die nur von einem der beiden Isoenzyme ausgeübt werden können. [70-72].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen wird die CK2 weder über "second messenger" wie cAMP, noch über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung im aktiven Zentrum reguliert, woraus geschlossen wurde, dass sie konstitutiv aktiv ist [73, 74]. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass durch die subzelluläre Lokalisation oder die Assoziation mit bestimmten Proteinen Subpopulationen der CK2 entstehen, die unabhängig voneinander reguliert werden können [75]. Zudem deuten kristallographische Untersuchungen darauf hin, dass sich inaktive polymere Komplexe, bestehend aus mehreren Holoenzymen, ausbilden können, was zur Regulation der Aktivität beitragen könnte [76].

Die CK2 benötigt zur Phosphorylierung ein Serin oder Threonin in saurer Umgebung; die minimale Konsensussequenz lautet S/T-x₁-x₂-E/D/pS. Prolin, Lysin oder Arginin an Position

x₁ wirken sich negativ auf die Phosphorylierung aus, wohingegen weitere saure Aminosäuren einen positiven Einfluss besitzen [77-79]. Die CK2 ist auch in der Lage Tyrosin zu phosphorylieren, jedoch wurde diesbezüglich bisher erst ein Substrat beschrieben [80]. Experimentell wurden bislang über 300 Substrate nachgewiesen [78], wobei Phosphoproteom-Analysen darauf hindeuten, dass es deutlich mehr geben könnte [81, 82]. Bei den beschriebenen Substraten handelt es sich um Proteine aus vielen verschiedenen Bereichen, gehäuft kommen solche vor, die bei der Transkription, der Translation oder der Signalweiterleitung eine Rolle spielen, sowie virale Proteine. Zudem reguliert die CK2 den Zellzyklus und wirkt antiapoptotisch [83-85]. Die Überexpression der CK2 hat einen transformierenden Effekt [86]. Passend dazu wurde bereits in vielen Tumoren eine Erhöhung des CK2-Gehalts und der CK2-Aktivität festgestellt [87-90], was sogar teilweise mit einer schlechteren Prognose einhergeht [91].

Die CK2 ist für Säugetiere eine essentielle Kinase, deren Verlust nicht mit dem Leben vereinbar ist. Untersuchungen zu ihrer Aktivität in Mausembryonen ab E8 ergaben, dass ihre Aktivität während der Organentwicklung und Gewebedifferenzierung an E12-14 zwei- bis dreifach erhöht ist und bis zur Geburt wieder auf ihr Grundniveau absinkt [92]. Die Erhöhung der CK2-Aktivität während bestimmter Entwicklungsstadien konnte auch für *C. elegans* [93] und die Leberentwicklung der Ratte [94] gezeigt werden. Die Expression von CK2 α und β ist während der Embryogenese der Maus an E10.5-11.5 im Neuroepithel und anderen Epithelien am stärksten. Ab E16.5 ist sie ebenfalls in allen an der Organogenese beteiligten Geweben erhöht [95]. Über die Expression von CK2 α' während der Embryogenese der Maus ist nichts bekannt, im adulten Tier findet man eine erhöhte Expression in Gehirn, Hoden und Spermien [70]. Eine gewebeabhängige Expression der einzelnen Untereinheiten wurde auch für Hühner beschrieben [96]. "Knock-out"-Studien in Mäusen zeigten, dass die Deletion von CK2 α oder CK2 β zu embryonaler Letalität führt. Der Verlust von CK2 β bewirkt, dass die Embryonen an E7.5 resorbiert werden. Vergleiche mit Wildtyp (WT) Embryonen an E6.5 zeigen, dass sich die CK2 β deletierten Embryonen deutlich kleiner und weniger entwickelt darstellen, da sie nicht in der Lage sind im Blastozysten-Stadium eine innere Zellmasse auszubilden. Versuche, embryonale CK2 $\beta^{-/-}$ Fibroblasten oder Stammzellen zu generieren, schlugen aufgrund des sofortigen Absterbens der Zellen ebenfalls fehl [97]. Die CK2 $\alpha^{-/-}$ Embryonen sterben an E11 aufgrund schwerer Defekte des Herzens. Das Herz schlägt zu früheren Zeitpunkten zwar und es lassen sich auch Herzmarker nachweisen, jedoch ist es stark vergrößert und es bilden sich keine Kammern aus. Daneben ist die Schließung des Neuralrohrs unvollständig und als Folge davon das Gehirn verkleinert [98-100]. Im Gegensatz zu CK2 α und β sind CK2 α' "knock-

out" Mäuse lebensfähig. Weibliche Tiere unterscheiden sich nicht von ihren WT Geschwistern, männliche Tiere sind jedoch steril. Die Entwicklung der Geschlechtsorgane verläuft bei ihnen normal, jedoch weisen die Spermien einen Entwicklungsdefekt auf und neigen verstärkt zur Apoptose. Der beobachtete Phänotyp ist vergleichbar mit der Globozoospermie beim Menschen [70, 101]. CK2 α' scheint also eine Rolle bei der Spermatogenese zu besitzen, die nicht durch CK2 α übernommen werden kann. Die Beobachtung, dass CK2 α und α' nicht vollständig redundant sind, zeigt sich auch bei der kombinierten Deletion beider katalytischer Untereinheiten. In Deletionsstudien an Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Mäuse lebensfähig sind, solange ein CK2 α -Allel vorhanden ist (Genotyp CK2 $\alpha^{+/-}$ CK2 $\alpha'^{-/-}$). Allerdings liegt die Geburtsrate um etwa 50% unter der erwarteten Zahl an Nachkommen, was darauf schließen lässt, dass ein CK2 α Allel nicht immer ausreicht. Die lebenden Nachkommen durchlaufen eine normale Entwicklung, wiegen jedoch Zeit ihres Lebens signifikant weniger als ihre Geschwister mit mindestens zwei katalytischen Allelen. Untersuchungen ergaben, dass diese Tiere nur etwa 50% des Fettgewebes ihrer Geschwister besitzen, obwohl sie die gleiche Ernährung erhielten [102].

Während die essentielle Bedeutung der CK2 für die Entwicklung eines gesamten Organismus unbestritten ist, beginnt man gerade erst damit, ihre Rolle bei der Differenzierung einzelner Gewebe zu untersuchen und zu verstehen. Die hohe Expression aller Untereinheiten im Gehirn lässt darauf schließen, dass die CK2 bei der neuralen Differenzierung eine Rolle spielen könnte. So führt eine Unterbrechung der CK2 β Expression in neuronalen Stammzellen zu einer stark eingeschränkten Proliferation und zu einer geringeren Differenzierung von Oligodendrozyten, was wiederum zu einer veränderten Gehirnstruktur führt [103]. Durch das gezielte Ausschalten der CK2 Untereinheiten mit Antisense-Oligonukleotiden kann die Neuritogenese in Neuroblastomzellen gestört werden [104]. CK2 α' könnte über die Phosphorylierung von MAP1B eine Rolle bei der Dendritenreifung und Synaptogenese spielen [105]. Der CK2 wurde auch bei anderen Differenzierungsprozessen eine Rolle zugeschrieben: bei der myogenen Differenzierung [106, 107], der Osteoblastendifferenzierung [108-110], sowie bei der Differenzierung des haematopoetischen Systems [111, 112]. Daneben ist die CK2 wichtig für die Adipogenese. In 3T3-L1 Zellen führt die Hemmung der CK2 mit DMAT oder Quinalizarin zum Ausbleiben der Differenzierung. Wichtig ist dabei, dass die Hemmung zu frühen Zeitpunkten stattfinden muss, da eine Hemmung zu späteren Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Differenzierung mehr hat [113].

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die nähere Charakterisierung der Rolle der Proteinkinase CK2 bei Differenzierungsprozessen. Zur Untersuchung der Adipogenese stehen die murine Präadipozytenzelllinie 3T3-L1, sowie in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut St.Ingbert humane mesenchymale Stammzellen zur Verfügung. Zur Überprüfung einer generellen Rolle der CK2 auf die Differenzierung, wird in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schäfer der Hochschule Kaiserslautern, Standort Zweibrücken als weiteres Modell die neurale Differenzierung von Stammzellen aus der SVZ postnataler Mäuse untersucht. In den SVZ-Neurosphären sollen nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit den spezifischen Hemmstoffen CX-4945 und Quinalizarin die Auswirkungen auf die neuronale und gliale Differenzierung, sowie auf die Stammzellpopulation insgesamt analysiert werden. Dazu werden mit den Methoden Immunfluoreszenz und Western Blot spezifische Markerproteine detektiert.

In hMSC sollen die bereits bekannten Wirkungen der CK2 bezüglich der Adipogenese überprüft werden. Dazu werden zunächst die Expression der CK2-Untereinheiten und die CK2-Aktivität während der normalen Differenzierung untersucht. Anschließend soll überprüft werden, ob auch hier eine Hemmung der CK2 mit CX-4945 und Quinalizarin zum Ausbleiben der Differenzierung führt. Falls sich dies bestätigt, soll die Expression des Schlüsselfaktors PPAR γ 2 untersucht werden, da dieser in 3T3-L1 Zellen nach Hemmung der CK2 nicht mehr exprimiert wird.

Mit Hilfe der 3T3-L1 Zellen soll erarbeitet werden, wo genau die Proteinkinase CK2 während der Differenzierung eingreift. Zur Untersuchung stehen der Protein-Nachweis mittels Western Blot und Immunfluoreszenz, die mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR), der "pull-down" mittels DNA-Sonde, der Promotor-Reporterassay, sowie der miRNA-Nachweis mittels Northern Blot zur Verfügung.

Langfristig geht es um die Frage, ob man mit Hilfe von Hemmstoffen der CK2-Aktivität bzw. durch Ausschalten der CK2-Expression gezielt in Differenzierungsvorgänge eingreifen kann. Im konkreten Fall der Adipogenese heißt das, ob man das Krankheitsbild Adipositas auf diese Weise verhindern kann.

4. Materialien

4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

1.7 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
6/24-Loch Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
15 ml/50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
60/100/145 mm Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
96-Loch Platten transparent/weiß Nunc®	Sigma-Aldrich, München
175 cm ² CELLSTAR® Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Autoklav Varioklav® 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman, München
Brutschrank 6000 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Inc., Hanau
CoolCell LX	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Corex®-Röhrchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dampfsterilisator Varioklav 500	H+P Labortechnik GmbH, München
Deckgläschen rechteckig, 24x50 mm, No.1	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Deckgläschen rund, Durchmesser 12 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Own Systems P9DS	Systems, Inc., Portsmouth
Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small	Hoefer Inc., Holliston
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Glasplatten für Elektrophorese	Hoefer Inc., Holliston
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Filterspitzen (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht oder nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Hamilton MICROLITER Spritze	Hamilton, Bonaduz
Heizblock	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Infinite M200 Pro TECAN Reader	Sigma-Aldrich, München
Inkubator	Heraeus Inc., Hanau
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma-Aldrich, München
Labor-Glasware	Schott, Mainz
Light Cycler®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Milli-Q Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Millipore, Schwalbach/Ts
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Nucleobond®-Säulen	Macherey Nagel, Düren
Nunc® Lab-Tek® 8-Loch Permanox®-Slides	Sigma-Aldrich, München
Nylonmembran Hybond N	Amersham Biosciences, München
P81 Ionenaustausch-Filterpapier	Whatman, Kent
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR Reader (Mastercycler Gradient)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
PCR Reader (MJ Mini™)	BioRad, München
Petrischalen 94 mm	Greiner, Nürtingen
pH-Meter, pH537	WTW, Weilheim
Phosphor Imaging-Platte (Storage Phosphor Screen)	Amersham Biosciences, München
Pipette (10 µl)	Abimed, Düsseldorf
Pipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson, Villiers le Bel
Pipette Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Pipettenspitzen (10 µl)	ULPlast, Warschau
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe oder nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Powergeräte	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
Röntgenfilm (AGFA Cronex 5)	AGFA-Gevaert, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gevaert, Belgien
Rotationsofen UM 400B Hyb	Bachofer GmbH, Reutlingen
Semi-dry Electro-Blotter Maxi 20 x 20cm	STARLAB GmbH, Hamburg
Sterilbank LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Szintillationsanalysator 190S AB/LA	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer IKA® RCTbasic	IKA® GmbH und Co. KG, Staufen
Thermoschüttler CertoMat® H	Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Ultraschallbad Transonic 460	Elma GmbH, Singen/Htw
Typhoon Scanner 9410	GE Healthcare, München
Universal Hood II-System	BioRad, München
UV-Quarzküvette 10 mm	Hellma, Müllheim
UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer GmbH, Reutlingen
UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience, München
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL Laborgeräte, Burgwedel
Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α -MEM-Medium, DMEM-Medium	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Sigma-Aldrich, München
BioRad Protein Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie-Brilliant-Blue G250 und R250	Boehringer, Ingelheim
CX-4945	Selleckchem, Houston
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Denhardt's Lösung (50x)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, München
ECL Lumilight System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDC-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
EDTA	Pharmacia Biotech, Schweden
Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
FCS	Gibco BRL, München
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Glutathion	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA	AppliChem, Darmstadt
LB-Broth-Medium	Sigma-Aldrich, München
Lysepuffer (Cell Culture Lysis 5x Reagent)	Promega GmbH, Mannheim
Lysepuffer (Passive Lysis 5x Reagent)	Promega GmbH, Mannheim
Methylimidazol	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphatase-Inhibitor PhosSTOP™	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
ProLong® Diamond Antifade Mountant mit DAPI	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences AB, Uppsala
Quinalizarin	Labotest OHG, Niederschöna
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
SequaGel – UreaGel System	National Diagnostics, Hessle

SuperSignal® West Dura Extended Duration
Substrate
TEMED
Tetracyclin
Trizol Reagenz

Triton X-100
Trypanblau
Trypsin
Tween-20
Unstained Protein Molecular Weight Marker
ViaFect™ Transfektionsreagenz
Verschiedene gewöhnliche Laborchemikalien

Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

Sigma-Aldrich, München
MP Biomedicals, Heidelberg
Peqlab Biotechnologie GmbH,
Erlangen
Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Biochrom GmbH, Berlin
Sigma-Aldrich, München
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Promega GmbH, Mannheim
Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich,
München; Carl Roth GmbH, Karlsruhe;
Fischer, Saarbrücken

4.1.3 Radiochemikalien

[³²P]-γ-ATP (10 µCi/µl)
[³²P]-α-UTP (10 µCi/µl)

Hartmann Analytic, Braunschweig
Hartmann Analytic, Braunschweig

4.1.4 Enzyme

CK2-Holoenzym

DNase I
Klenow Fragment
Phusion High-Fidelity Polymerase
RNase A
T7-RNA-Polymerase
Taq-DNA-Polymerase

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh,
Universität des Saarlandes
New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

4.1.5 Experimentelle Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System
GeneJET Genomic DNA Purification Kit
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein
Luciferase Assay System, 10 Pack
µMACS Streptavidin Kit

Nucleobond® PC 100 Kit
peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit
ProQ® Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit
QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit

Promega GmbH, Mannheim
Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Promega GmbH, Mannheim
Miltenyi Biotec GmbH,
Bergisch Gladbach
Macherey-Nagel, Düren
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Molecular Probes, Inc., Eugene
Qiagen GmbH, Hilden

4.2 Molekulargewichtsmarker

4.2.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Größen- und Mengenabschätzung kleinerer doppelsträngiger DNA-Fragmente wird der "GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder" verwendet. Er besteht aus 14 individuellen DNA-Fragmenten, die eine Größe von 100 bp bis 3000 bp abdecken [bp]: 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100. Der DNA-Marker enthält zwei Referenzbanden zur leichteren Orientierung (fett).

Zur Größen- und Mengenabschätzung größerer durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennter DNA-Fragmente wird der "Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder" verwendet. Er besteht aus 14 individuellen DNA-Fragmenten, die eine Größe von 250 bp bis 10000 bp abdecken [bp]: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250. Der DNA-Marker enthält drei Referenzbanden zur leichteren Orientierung (fett).

Von beiden Markern werden 8 µl der Konzentration 0.5 µg/µl eingesetzt.

4.2.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Der "Prestained Protein Molecular Weight Marker" ist ein Proteinstandard mit sechs Proteinen, die ein Molekulargewicht von 20 kDa bis 120 kDa abdecken: 120 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*); 85 kDa: Rinderserumalbumin (Rinderplasma); 50 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß); 35 kDa: Carboanhydrase (Rindererythrocyten); 25 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch); 20 kDa: Lysozym (Hühnereiweiß). Der "Prestained Protein Molecular Weight Marker" wird zur Darstellung der Proteinauftrennung während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Verifizierung der Western Blot-Transfereffizienz auf die PVDF-Membran und zur Abschätzung der Proteingröße verwendet. Alle Proteine des Markers sind kovalent an einen blauen Chromophor gekoppelt.

Werden die Proteine nicht auf eine PVDF-Membran transferiert, sondern im SDS-Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Blau angefärbt, wird der "Unstained Protein Molecular Weight Marker" verwendet. Er ist zur Abschätzung der Proteingröße geeignet, muss jedoch ebenfalls erst mit Coomassie-Blau angefärbt werden. Er ist ein Proteinstandard mit 7 Proteinen, die ein Molekulargewicht von 14.5 bis 116 kDa abdecken. Er setzt sich aus folgenden Proteinen bekannter Größe zusammen: 116 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*); 66.2 kDa: Rinderserumalbumin; 45 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß); 35 kDa: Lactat-Dehydrogenase (Rindermuskel); 25 kDa: *REase* Bsp981 (*E. coli*); 18.4 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch) und 14.5 kDa: Lysozym (Hühnereiweiß).

4.3 Antikörper

4.3.1 Primärantikörper

Aktin-Antikörper

Aktin wird mit dem polyklonalen Ziegeantikörper sc-1615 der Firma Santa Cruz Biotechnology detektiert. Der Antikörper erkennt eine Bande bei 43 kDa. Er wird im Verhältnis 1:1000 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt.

α -Tubulin-Antikörper

Zur Detektion des α -Tubulins wird der monoklonale Mausantikörper DM 1A der Firma Sigma[®] verwendet. Der Antikörper detektiert im Western Blot eine Bande bei ca. 55 kDa. Er wird im Verhältnis 1:2000 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver verwendet. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei RT.

β -III-Tubulin-Antikörper

Die Detektion des β -III-Tubulins erfolgt mit dem monoklonalen Mausantikörper MAB1637 der Firma Millipore. Der Antikörper erkennt im Western Blot eine Bande bei 50 kDa und wird im Verhältnis 1:500 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. In der Immunfluoreszenz wird der Antikörper im Verhältnis 1:200 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) eingesetzt.

C/EBP α -Antikörper

Das CCAAT/Enhancer-Bindeprotein α wird mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper ab40764 der Firma Abcam[®] detektiert. Er erkennt im Western Blot eine Bande bei ca. 34 kDa. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:5000 verdünnt in 1xTBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C.

C/EBP β -Antikörper

Zur Detektion des CCAAT/Enhancer-Bindeprotein β wird der polyklonale Kaninchenantikörper #3087 der Firma Cell Signaling Technology verwendet. Der Antikörper detektiert im Western Blot zwei Banden bei 34 kDa (LAP*) und bei 37 kDa (LAP). Er wird im Western Blot im Verhältnis 1:1000 verdünnt in 1xTBST (pH 7.5) mit 5% (w/v) BSA und in der Immunfluoreszenz im Verhältnis 1:100 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C.

C/EBP δ -Antikörper

Die Immunpräzipitation des CCAAT/Enhancer-Bindeproteins δ erfolgt mit dem polyklonalen

Kaninchenantikörper sc-636 der Firma Santa Cruz Biotechnology. Es wird eine Menge von 4 µg pro mg eingesetztem Zellkernextrakt verwendet. Für die Detektion im Western Blot und in der Immunfluoreszenz wird der polyklonale Kaninchenantikörper sc-151 verwendet. Er detektiert im Western Blot eine Bande bei 36 kDa und wird im Verhältnis 1:200 verdünnt in 1xTBST (pH 7.5) mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wird er im Verhältnis 1:100 in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA verdünnt. Die Inkubation erfolgt jeweils über Nacht bei 4°C.

CK2-Antikörper

Zur Detektion der CK2-Untereinheiten werden entweder die polyklonalen Kaninchenserum #26 (CK2α), #30 (CK2α') und #32 (CK2β) [114] oder die monoklonalen Mausantikörper 1A5 (CK2α) und 6D5 (CK2β) [115, 116] verwendet. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Montenarh in Auftrag gegeben oder selbst hergestellt. Sie erkennen eine Bande bei 43 kDa (CK2α), bei 42 kDa (CK2α') oder bei 26 kDa (CK2β). Die Kaninchenserum werden im Western Blot im Verhältnis 1:1000 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver und in der Immunfluoreszenz 1:100 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA eingesetzt. Die Mausantikörper verwendet man im Western Blot in einer Verdünnung von 1:200 in 1xTBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver. In der Immunfluoreszenz wird der Antikörper 1A5 im Verhältnis 1:10 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei RT (Kaninchen) oder über Nacht bei 4°C (Maus). Zum Nachweis von CK2β dient zusätzlich der monoklonale Mausantikörper sc-46666 der Firma Santa Cruz Biotechnology. Er wird im Western Blot in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver verwendet.

FLAG-Antikörper

Zur Detektion von FLAG-Fusionsproteinen wird der monoklonale Mausantikörper M2 der Firma Sigma® verwendet. Er wird im Western Blot im Verhältnis 1:2000 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver und für die Immunfluoreszenz im Verhältnis 1:600 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA eingesetzt.

GAPDH-Antikörper

GAPDH wird mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper sc-25778 der Firma Santa Cruz Biotechnology nachgewiesen. Der Antikörper erkennt eine Bande bei 36 kDa. Die Verdünnung beträgt 1:1000 in 1xTBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver. Die Inkubation erfolgt 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

GFAP-Antikörper

Die Detektion des "glial fibrillary acidic protein" erfolgt mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper Z0334 der Firma Dako. Der Antikörper erkennt im Western Blot eine Bande bei 50 kDa und wird in einer Verdünnung von 1:5000 in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wird er im Verhältnis 1:500 in 1xPBS (pH 7.4) verdünnt. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei RT.

HSP70-Antikörper

Das "heat-shock protein 70" wird mit dem monoklonalen Mausantikörper SM5066 der Firma Acris Antibodies GmbH nachgewiesen. Es erkennt eine Proteinbande bei 70 kDa und wird in einer Verdünnung von 1:1000 in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver verwendet. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei RT.

Nestin-Antikörper

Die Detektion von Nestin erfolgt mit dem monoklonalen Mausantikörper MAB353 der Firma Millipore. Der Antikörper wird in der Immunfluoreszenz im Verhältnis 1:250 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) eingesetzt.

phospho-Nestin (Thr316)-Antikörper

An Threonin 316 phosphoryliertes Nestin wird mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper sc-33879 der Firma Santa Cruz Biotechnology nachgewiesen. Der Antikörper erkennt im Western Blot eine Bande bei ca. 190 kDa und wird im Verhältnis 1:200 verdünnt in 1xTBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver über Nacht bei 4°C eingesetzt. In der Immunfluoreszenz wird er in einer Verdünnung von 1:200 in 1xPBS (pH 7.4) verwendet.

Nukleolin-Antikörper

Zur Detektion von Nukleolin wird das polyklonale Kaninchenserum #36 der Arbeitsgruppe von Prof. Montenarh verwendet [117]. Es detektiert eine Bande bei 85 kDa und wird im Western Blot im Verhältnis 1:1000 verdünnt in 1xPBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver eingesetzt.

Perilipin-Antikörper

Zur Detektion von Perilipin wird der polyklonale Kaninchenantikörper #3470 der Firma Cell Signaling Technologies verwendet. Er erkennt eine Bande bei 62 kDa und wird in der Verdünnung 1:1000 in 1xTBST (pH 7.5) mit 5% (w/v) BSA eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wird der Antikörper im Verhältnis 1:100 in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA verdünnt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht.

PPAR γ -Antikörper

Der Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptor γ wird im Western Blot mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper #2430 der Firma Cell Signaling Technology detektiert. Der Antikörper erkennt zwei Banden bei 53 kDa (PPAR γ 1) und 57 kDa (PPAR γ 2). Er wird in der Verdünnung 1:1000 in 1xTBST (pH 7.5) mit 5% (w/v) BSA über Nacht bei 4°C eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wird der polyklonale Kaninchenantikörper ab45036 der Firma Abcam[®] verwendet, der lediglich die Isoform PPAR γ 2 erkennt. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:500 in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA verdünnt.

SREBP-1-Antikörper

Zur Detektion des "sterol regulatory element-binding protein-1" wird der monoklonale Mausantikörper sc-13551 der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet. Er detektiert mehrere Banden bei 114-120 kDa (Volllänge) und bei 68 kDa (Spaltprodukt). Der Antikörper wird im Verhältnis 1:100 verdünnt in 1xTBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver verwendet. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C.

TBP-Antikörper

Das TATA-Box-Bindeprotein wird im Western Blot mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper sc-273 der Firma Santa Cruz Biotechnology nachgewiesen. Er detektiert eine Bande bei 36 kDa und wird in einer Verdünnung von 1:250 in 1xTBST (pH 7.5) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver über Nacht bei 4°C eingesetzt.

4.3.2 Sekundärantikörper

Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse mit monoklonalen Mausantikörpern wird ein Ziege-Anti-Maus-Ig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper im Verhältnis 1:10000 verdünnt verwendet. Zum Nachweis mono- oder polyklonaler Kaninchenantikörper dient ein Ziege-Anti-Kaninchen-Ig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper in einer Verdünnung von 1:30000 und zum Nachweis polyklonaler Ziegeantikörper ein Maus-Anti-Ziege-Ig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper in der Verdünnung 1:10000. Die Sekundärantikörper werden abhängig vom Primärantikörper im entsprechenden Inkubationspuffer (1% oder 5% (w/v) Trockenmilchpulver oder 5% (w/v) BSA in 1xPBST oder 1xTBST) verdünnt.

Alle Sekundärantikörper stammen von der Firma Dianova (Hamburg) und liegen in einer Konzentration von 0.8 mg/ml vor.

Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wird das Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Maus-IgG-Konjugat, das Alexa Fluor 546 Ziege-Anti-Maus-IgG-Konjugat, das Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugat oder das Alexa Fluor 594 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugat der Firma Molecular Probes eingesetzt. Alle Antikörper besitzen die Konzentration 2 mg/ml und werden im Verhältnis 1:1000 verdünnt in 1xPBS (pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA verwendet.

Für die Immunfluoreszenz-Färbung der SVZ-Neurosphären werden die Alexa Fluor 488 Esel-Anti-Maus-IgG- und Alexa Fluor 594 Esel-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugate der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Sie besitzen ebenfalls eine Konzentration von 2 mg/ml und werden in einer Verdünnung von 1:500 in 1xPBS (pH 7.4) eingesetzt.

4.4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1 blue

Diese Bakterien werden zur Plasmidamplifikation verwendet. Zur Selektion besitzen sie eine Tetracyclinresistenz. Quelle: Stratagene, Waldbronn

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* {F' *proAB lacI*^qΔ*M15* Tn10 (Tet^R)}

4.5 Zellsysteme

Tabelle 1: Verwendete Zellsysteme

Name	Beschreibung	Quelle
3T3-L1	Murine Präadipozyten-Zelllinie (ATCC® CL-173™), Differenzierung zu Adipozyten möglich	AG Stahl, Homburg
HCT116	Humane Colonkrebszellen (ATCC® CCL-247™)	AG Rother, Homburg
hMSC	Primäre humane mesenchymale Stammzellen, isoliert aus dem <i>Caput femoris</i> , Differenzierung zu Adipozyten, Knochen- und Knorpelzellen möglich	Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT, St.Ingbert
SVZ	Primäre neurale Stammzellen, isoliert aus 2-5 Tage alten Balb/c Mäusen, Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen möglich	Prof. Dr. Karl-Herbert Schäfer, Zweibrücken

4.6 Primer

Tabelle 2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Basensequenz 5' - 3'	Primer- typ	Schnitt- stelle	eingesetzte Anlagerungs- temperatur
Klonier-Primer mPPAR γ 2-Promotor -1300 for	AGA GAG CTC GAG GGG GAG TCA TTA AAT GAT G	5'	XhoI	60°C
Klonier-Primer mPPAR γ 2-Promotor rev	AGA GAG CCA TGG ACA GCA TAA AAC AGA GAT TTG	3'	NcoI	60°C
miRNA-Primer mmu-miR-27a-3p_T7	TTC ACA GTG GCT AAG TTC CGC CCT GTC TC	5'	-	-
miRNA-Primer mmu-miR-27b-3p_T7	TTC ACA GTG GCT AAG TTC TGC CCT GTC TC	5'	-	-
miRNA-Primer mmu-miR-130a-3p_T7	CAG TGC AAT GTT AAA AGG GCA TCC TGT CTC	5'	-	-
miRNA-Primer mmu-miR-130b-3p_T7	CAG TGC AAT GAT GAA AGG GCA TCC TGT CTC	5'	-	-
pull-down-Primer PD_for_PPAR γ 2	GAA CAG TGA ATG TGT GGG TC	5'	-	50°C
pull-down-Primer PD_rev-biotin_PPAR γ 2	Biotin-ATA TGC TAA TAA GTC AAG ACA CCA G	3'	-	50°C
qRT <i>real time</i> PCR LC_18S rRNA_for	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR LC_18S rRNA_rev	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CGA	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR mC/EBP α for	GAC TTC TAC GAG GTG GAG C	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR hC/EBP α rev	TCG ATG TAG GCG CTG ATG TC	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR mC/EBP β for	CAA CTT CTA CTA CGA GCC CGA C	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR C/EBP β rev	GGA GAG GAA GTC GTG GTG C	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR mC/EBP δ for	AGA CAG TGG TGA GCT TGG C	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR hC/EBP δ rev	TCT GCT GCA TCT CCT GGT TG	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR LC-Primer CK2 α forward mouse	AGG GCC AGA GTT TAC ACA GAT	5'	-	60°C

qRT <i>real time</i> PCR LC-Primer CK2 α reverse mouse	GAT GGC TTC AAA CAC TTC ACT G	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR LC-Primer CK2 β forward mouse	GGT GCC TCA CTA TCG ACA AG	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR LC-Primer CK2 β reverse mouse	AAA GTC TCC CTG CTG GTA CT	3'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR mPPAR γ 2 for	TCC TGT TGA CCC AGA GCA TG	5'	-	60°C
qRT <i>real time</i> PCR mPPAR γ 2 rev	CAT CAC GGA GAG GTC CAC AG	3'	-	60°C

4.7 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Details	Hersteller
p3xFLAG/CMV-7.1 C/EBP δ_{wt}	AMP	Humane Volllängen C/EBP δ cDNA (810 bp)	L. Schwind
p3xFLAG/CMV-7.1 C/EBP δ_{S57A}	AMP	Humane Volllängen C/EBP δ cDNA (810 bp) mit Austausch von AGC an Position 169/170 durch GCC (auf Proteinebene: S57A)	L. Schwind
p3xFLAG/CMV-7.1 C/EBP δ_{S57D}	AMP	Humane Volllängen C/EBP δ cDNA (810 bp) mit Austausch von AGC an Position 169/170 durch GAC (auf Proteinebene: S57D)	L. Schwind
p3xFLAG/CMV-7.1 CK2 α	AMP	Humane CK2 α cDNA (1176 bp)	S. Kartarius
p3xFLAG/CMV-7.1 CK2 β	AMP	Humane CK2 β cDNA	S. Kartarius
p3xFLAG/CMV-7.1 Leervektor (LV)	AMP	Eukaryonter Expressionsvektor ohne Insert, wird zur Kontrolle verwendet	Sigma- Aldrich, München
pGL4.10- Leervektor (LV)	AMP	<i>luc2</i> -Gen tragender Reportervektor ohne Promotor, wird zur Kontrolle verwendet	Promega GmbH, Mannheim
pGL4.10-PPAR γ 2	AMP	Maus PPAR γ 2-Promotor, nt -1263/+36	L. Schwind

pGL4.70[<i>hRluc</i>]	AMP	<i>hRluc</i> -Gen tragender Reportervektor, wird zur Normierung der Transfektionseffizienz verwendet	Promega GmbH, Mannheim
-------------------------	-----	--	------------------------

4.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer für die Agarosegelelektrophorese

DNA-Probenpuffer (6x)	80% 2x TAE-Puffer 20% Glycerol 0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF Lagerung bei Raumtemperatur
Ethidiumbromid	10 mg/ml gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer (10x), pH 7.2	400 mM Tris-Acetat 200 mM Na-Acetat 10 mM Na ₃ -EDTA gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 5: Antibiotika und Puffer für die Bakterienkultur

Ampicillin	50 mg/ml gelöst in H ₂ O _{reinst} , sterilfiltriert Lagerung bei -20°C
LB-Broth-Agarplatten, pH 7.3	2% Bacto-Agar 1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert vor Gebrauch gewünschte Antibiotika zusetzen (50 µg/ml Ampicillin, 12.5 µg/ml Tetracyclin) Lagerung bei 4°C
LB-Broth-Medium, pH 7.3	1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur

SOB-Medium	2% Bacto-Trypton 0.5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur
SOC-Medium	20 mM Glucose (steril) gelöst in SOB-Medium Lagerung bei Raumtemperatur
Tetracyclin	6.5 mg/ml gelöst in Ethanol absolut Lagerung bei -20°C
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>)	100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur
TfBII (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>), pH 7.0	10 mM Na-MOPS 10 mM KCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol gelöst in H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur
TYM-Medium, pH 7.3	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g MgSO ₄ gelöst in 1 l H ₂ O _{reinst} , autoklaviert Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 6: Puffer für die Plasmid-Isolation

Puffer S1, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
-------------------	---

Puffer S2	0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer S3, pH 5.1	2.8 M K-Acetat gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
Puffer N2, pH 6.3	100 mM Tris-HCl 1.15 M KCl 15% Ethanol 0.15% (v/v) Triton X-100 gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N3, pH 6.3	100 mM Tris-HCl 1.15 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N5, pH 8.5	100 mM Tris-HCl 1 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 7: Puffer für die Phenol/Chloroform Extraktion

Protein-Waschpuffer, pH 7.5	0.3 M Guanidinhydrochlorid gelöst in 95% Ethanol Lagerung bei Raumtemperatur
Protein-Extraktionspuffer, pH 8.0	8 M Harnstoff 200 mM NaCl 47.4 mM Na ₂ HPO ₄ 2.6 mM NaH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur frisch dazu: 50 mM DTT

Tabelle 8: Medien für die Zellkultur

Dexamethason Stocklösung	0.25 mM Dexamethason gelöst in Ethanol absolut Lagerung bei -20°C (Langzeit), 4°C (kurzzeitig)
--------------------------	---

Differenzierungsmix I	DMEM (25 g Glukose/l) + 10% FCS 0.5 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX) 0.25 µM Dexamethason 5 µg/ml Insulin die Lösung muss frisch angesetzt werden
Differenzierungsmix II	DMEM (25 g Glukose/l) + 10% FCS 5 µg/ml Insulin Lagerung bei 4°C
Differenzierungsmix für hMSC	α-MEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS 500 µM IBMX 100 nM Dexamethason 200 µM Indomethacin 100 ng/ml Insulin die Lösung muss frisch angesetzt werden
Differenzierungsmix für SVZ	20 µM Retinsäure gelöst in Proliferationsmedium die Lösung muss frisch angesetzt werden
IBMX Stocklösung	11.11 mg/ml IBMX gelöst in Ethanol absolut Lagerung bei -20°C (Langzeit), 4°C (kurzzeitig)
Oil Red O-Lösung	0.5% (w/v) Oil Red O gelöst in Isopropanol, 3:2 verdünnt mit H ₂ O _{reinst} , filtriert Lagerung bei Raumtemperatur (dunkel) sollte regelmäßig frisch angesetzt werden
Proliferationsmedium für SVZ	DMEM/F12 mit den Zusätzen: 1% BSA 2% B27 Supplement ohne Retinsäure 1% Penicillin/Streptomycin 0.1% β-Mercaptoethanol Lagerung in 25 ml Aliquots bei 4°C frisch dazu: 20 ng/ml FGF 10 ng/ml EGF
Trypanblau-Lösung	0.4% (w/v) Trypanblau gelöst in 1xPBS (pH 7.4) Lagerung bei 4°C
Trypsin/EDTA Lösung, pH 7.5	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA gelöst in 1xPBS, sterilfiltriert Lagerung bei 4°C

Tabelle 9: Puffer und Stocklösungen für zelluläre Proteinextraktion

Complete™ Proteaseinhibitor (25x)	1 Tablette gelöst in 2 ml H ₂ O _{reinst} Lagerung aliquotiert bei -20°C
Kernlysepuffer C, pH 7.9	20 mM HEPES-KOH 1.5 mM MgCl ₂ 0.2 mM EDTA gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C oder aliquotiert bei -20°C frisch dazu: 0.5 mM DTT 450 mM NaCl
1xPBS, pH 7.4	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur oder bei 4°C
PhosSTOP Phosphataseinhibitor (10x)	1 Tablette gelöst in 1 ml H ₂ O _{reinst} Lagerung aliquotiert bei -20°C
Ripa-Puffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% (v/v) Triton X-100 0.1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei -20°C (Langzeit), 4°C (kurzzeitig)
Zelllysepuffer A, pH 7.9	10 mM HEPES-KOH 1.5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C oder aliquotiert bei -20°C frisch dazu: 0.5 mM DTT

Tabelle 10: Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
-----	---

Coomassie-Blau-Färbelösung	0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 50% Methanol 10% Essigsäure ad 100% H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei Raumtemperatur
Elektrophoresepuffer (10x), pH 8.8	250 mM Tris-HCl 1.92 M Glycin 35 mM SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur, verdünnt bei 4°C
Entfärbe-Lösung	10% Eisessig 20% Methanol 70% H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Gellösung A, Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid Lagerung bei 4°C
Gellösung B, Trenngel, pH 8.8	1.5 M Tris-HCl 14 mM SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
Gellösung C, Sammelgel, pH 6.8	495 mM Tris-HCl 14 mM SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
SDS-Probenpuffer (3x), pH 6.8	195 mM Tris-HCl 30% Glycerol 15% β-Mercaptoethanol 6% SDS 0.03% (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei -20°C (Langzeit), Raumtemperatur (kurzzeitig)

Tabelle 11: Puffer für Western Blot und die nachfolgende Proteindetektion

Blockpuffer, pH 7.4	5% (w/v) Trockenmilchpulver 0.05% (v/v) Tween-20 gelöst in PBS oder TBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C
---------------------	---

Entfärbelösung, pH 4.0	50 mM Natriumacetat 20% (v/v) Acetonitril gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei RT
Fixierlösung	7% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Methanol ad 100% H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei RT
H ₂ O ₂ -Lösung, pH 8.5	10 ml 1 M Tris-HCl 55 µl 35% (w/v) H ₂ O ₂ ad 100 ml H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei 4°C
Inkubationspuffer/Waschpuffer I	1% oder 5% (w/v) Trockenmilchpulver oder 5% (w/v) BSA 0.05% (v/v) Tween-20 gelöst in 1xPBS oder 1xTBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C
Luminol-Lösung, pH 8.5	10 ml 1 M Tris-HCl 1 ml 250 mM Luminol, gelöst in DMSO 440 µl 90 mM PCA, gelöst in DMSO, autoklaviert ad 100 ml H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei 4°C
Ponceau S-Lösung	0.2% (w/v) Ponceau S 15% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol ad 100% H ₂ O _{reinst} Lagerung dunkel bei Raumtemperatur
Pro Q [®] -Färbelösung	25 µl Pro Q [®] Diamond Blot Stain Reagent 25 ml Pro Q [®] Diamond Blot Stain Buffer Die Lösung muss frisch angesetzt werden
1xTBS, pH 7.5	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
Transferpuffer (10x), pH 8.3	200 mM Tris-HCl 1.5 M Glycin gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
Waschpuffer II (1xPBST, 1xTBST)	0.05% (v/v) Tween-20 gelöst in 1xPBS oder 1xTBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C

Tabelle 12: Puffer für Co-Immunpräzipitation

EBC-Puffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 100 mM NaF 200 µM Natriumorthovanadat 0.5% (v/v) NP-40 gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C
NETN-Puffer, pH 8.0	20 mM Tris 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0.5% (v/v) NP-40 gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei 4°C

Tabelle 13: Puffer für *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay

CK2 Kinasepuffer, pH 7.5	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung aliquotiert bei -20°C
CK2 Reaktionsmix, pH 8.5	41.6 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 8.4 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 84 mM ATP gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung aliquotiert bei -20°C frisch dazu: 0.32 mM synthetisches Peptid
Synthetisches Peptid für CK2 (Stocklösung)	12 mM synthetisches Peptid für CK2 gelöst in H ₂ O _{reinst} Sequenz: RRRDDDSDDD Lagerung aliquotiert bei -20°C

Tabelle 14: Puffer für Immunfluoreszenz (IF) und TUNEL-Assay

DAPI-Stammlösung, pH 7.4	5 µg/ml 20 µl werden in 980 µl 1xPBS gelöst Lagerung bei -20°C
Fixierlösung, pH 7.4	2% Formaldehyd gelöst in 1xPBS die Lösung muss frisch angesetzt werden

Mounting Medium, pH 7.4	10% Glycerol 5% (v/v) Polyvinylalkohol 25/140 gelöst in 1xPBS, autoklaviert Lagerung bei -20°C
Permeabilisierungslösung IF, pH 7.4	2% (w/v) BSA 0.2% (v/v) Triton X-100 gelöst in 1xPBS die Lösung muss frisch angesetzt werden
Permeabilisierungslösung TUNEL	0.1% (v/v) Triton X-100 gelöst in 0.1% (w/v) Natriumcitrat die Lösung muss frisch angesetzt werden
TUNEL-Reaktionsmix	10% (v/v) Enzym-Lösung 90% (v/v) Nukleotid-Lösung der Mix muss frisch angesetzt werden
Waschlösung, pH 7.4	1% (w/v) BSA gelöst in 1xPBS die Lösung muss frisch angesetzt werden

Tabelle 15: Puffer für miRNA-Analyse

Crosslinking-Puffer	245 µl Methylimidazol 0.75 g EDC-Hydrochlorid ad 24 ml H ₂ O _{reinst} die Lösung muss frisch angesetzt werden
Denhardt's Lösung (50x)	1% (w/v) BSA 1% (w/v) Ficoll 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung aliquotiert bei -20°C
Hochsalz-Waschpuffer	5x SSC 1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur vor Gebrauch auf 50°C erhitzen
Hybridisierungspuffer	7.5 ml 20x SSC 0.6 ml Na ₂ HPO ₄ 21 ml 10% SDS 0.6 ml 50x Denhardt's Lösung eine Spatelspitze Blockreagenz die Lösung muss frisch angesetzt werden vor Gebrauch auf 50°C erhitzen

MSE-Puffer (5x)	0.2 M 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) 5 mM Natriumacetat 5 mM EDTA gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Niedrigsalz-Waschpuffer	1x SSC 1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur vor Gebrauch auf 50°C erhitzen
RNA-Ladepuffer II	750 µl Formamid 150 µl 5x MSE-Puffer 240 µl Formaldehyd 200 µl 50% Glycerol eine Spatelspitze Bromphenolblau eine Spatelspitze Xylen-Cyanol FF 160 µl H ₂ O _{reinst} Lagerung bei -20°C
SSC (20x), pH 7.0	0.3 M tri-Natriumcitrat 3 M NaCl gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
Stripping-Puffer, pH 8.0	0.05 mM Tris 0.2 mM EDTA 0.05% (v/v) Natriumpyrophosphat 0.1x Denhardt's Lösung gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
TBE (10x), pH 8.3	0.89 M Tris 0.89 M Borsäure 20 mM Na ₂ EDTA gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
UreaGel Konzentrat	237.5 g Acrylamid 12.5 g Methylen-Bisacrylamid 7.5 M Harnstoff ad 1000 ml H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
UreaGel Puffer	7.5 M Harnstoff gelöst in 10x TBE Lagerung bei Raumtemperatur

UreaGel Verdünnung	7.5 M Harnstoff gelöst in H ₂ O _{reinst} Lagerung bei Raumtemperatur
--------------------	--

Tabelle 16: Puffer für MTT-Assay

MTT-Substratlösung, pH 7.4	1 mg MTT gelöst in 1 ml 1xPBS Lagerung dunkel bei 4°C
Solubilisierungslösung	10% (w/v) SDS 0.6% (v/v) Essigsäure ad 100% DMSO Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 17: Stocklösungen für CK2 Inhibitoren

CX-4945 Stocklösungen	10 mM CX-4945 oder 20 mM CX-4945 gelöst in DMSO Lagerung aliquotiert bei -20°C
Quinalizarin Stocklösung	20 mM Quinalizarin gelöst in DMSO Lagerung aliquotiert bei -20°C

5. Methoden

5.1 DNA-Techniken

5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente. Grundlage ist eine enzymatisch-katalysierte temperaturgesteuerte Kettenreaktion, die eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide, eine DNA-Matrize sowie Oligonukleotide (Primer) benötigt. Die Primer müssen zum 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks komplementär sein. Die PCR gliedert sich in drei Schritte, die 20-40 mal wiederholt werden.

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt.

Anlagerung: Die Temperatur wird auf 50-60°C abgesenkt, damit sich die Primer komplementär an die einzelsträngige Matrizen-DNA anlagern können.

Elongation: Ausgehend von den angelagerten Primern verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C den neuen Strang komplementär zum Matrizen-Strang.

Nach Beendigung der PCR kann das amplifizierte PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und, falls benötigt, aus dem Gel reisoliert werden.

Die Dauer und Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte sind abhängig von der Matrizen-DNA, der Schmelztemperatur der Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks und müssen daher für jede einzelne PCR angepasst werden.

5.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren. Die Proben werden mit 6x DNA-Probenpuffer (80% 2 x TAE-Puffer, 20% Glycerol, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF) versetzt (Endkonzentration 1x), in die Taschen eines Agarosegels geladen und unter Anlegung einer elektrischen Spannung (80 V) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 1 mM Na₃-EDTA, pH 7.2) der Größe nach aufgetrennt. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrads wandert die DNA zur Anode. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente verwendet man 1 bis 2%-ige Agarosegele. Mit Hilfe von Ethidiumbromid (0.625 µg/ml) können die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

5.1.3 Reisolation aufgetrennter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel

Die Reisolation von geschnittenen Fragmenten oder PCR-Produkten aus dem Agarosegel erfolgt mit dem peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit der Firma PeqLab. Die gewünschte Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Gelmatrix wird in 1 ml Kit-internem GP-Puffer bei 60-65°C für 10 Minuten aufgelöst. Nach dem Untermischen von 500 µl Kit-internem MCP-Puffer wird eine Säule in 750 µl-Schritten mit der gelösten DNA durch Zentrifugation bei 10000xg für 1 Minute beladen. Anschließend wird die Säule zweimal mit je 700 µl Kit-internem GC-Waschpuffer gewaschen, wobei vor der einminütigen Zentrifugation bei 10000xg eine Inkubationszeit von 2-3 Minuten einzuhalten ist. Durch erneute Zentrifugation wird die Säule vom restlichen Waschpuffer befreit. Zur Elution wird die Säule in ein neues steriles 1.5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt, 10-20 µl Kit-interner Elutionspuffer direkt auf die Säulenmatrix gegeben und nach einer Wartezeit von 2 Minuten wird 1 Minute bei 10000xg zentrifugiert. Der Elutionsschritt kann bei Bedarf wiederholt werden. Die eluierten DNA-Fragmente können bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird spektrometrisch die Absorption bei 260 nm (DNA/RNA) und bei 280 nm (Proteine) gemessen. Aus dem Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ kann die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung bestimmt werden. Bei ausreichender Reinheit beträgt der Quotient für DNA etwa 1.8 und für RNA 1.8-2.0. Die Konzentration errechnet sich aus der Absorption bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem Multiplikationsfaktor, der sich bei DNA und RNA unterscheidet. Die Konzentration kann man mit folgenden Formeln berechnen:

DNA-Konzentration = $A_{260\text{nm}} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

RNA-Konzentration = $A_{260\text{nm}} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

5.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind wichtige Werkzeuge der Molekularbiologie, da sie doppelsträngige DNA an einer für sie spezifischen Basenabfolge schneiden können. Bei Verwendung zweier unterschiedlicher Schnittstellen am 5' und 3' Ende des Templates ist es möglich, Gene gleich in der richtigen Orientierung in ein Plasmid einzubringen. In dieser Arbeit wurden zur Klonierung des PPAR γ 2-Reporterkonstrukts die beiden Restriktionsenzyme XhoI und NcoI der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Sie

werden im Doppelverdau unter den empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Für 1 µg DNA werden 3-4 U der Restriktionsenzyme verwendet. Der Ansatz wird 2-3 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Inaktivierung der Enzyme für 20 Minuten bei 80°C. Zur Aufreinigung der geschnittenen DNA wird der komplette Ansatz nach Zusatz von TAE-Ladepuffer in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus dem Gel reisoliert.

5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligation von DNA-Fragmenten wird mit dem Enzym T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase kann Esterbindungen zwischen freien 3'-OH-Enden und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle ausbilden. Sie wird benötigt wenn ein bestimmtes Gen (Insert) in einen Vektor eingefügt werden soll. Grundvoraussetzung für das Gelingen der Ligation ist, dass sowohl Insert als auch Vektor vorher mit den gleichen oder kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden. Ein Standard-Ligationsansatz hat folgende Zusammensetzung:

2 µl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
10 ng/kb	Vektor
50-100 ng/kb	Insert
1 µl	T4-DNA-Ligase (2 U/µl)
ad 20 µl	H ₂ O _{reinst}

Der Ansatz wird 1 Stunde bei 22°C oder über Nacht bei ca. 8°C inkubiert, gefolgt von der Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 Minuten. Die Hälfte des Ansatzes kann anschließend zur Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien eingesetzt werden. Zur Kontrolle wird ein Ligationsansatz mitgeführt, der ausschließlich den geschnittenen Vektor enthält. Dies dient zur Bestimmung der Selbstligationsrate des Vektors, die möglichst gering sein sollte.

5.1.7 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Transformationskompetente *E. coli* *XL1 blue* Bakterien werden nach der Methode von Hanahan [118] erzeugt. Zu 20 ml TYM-Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, 2 g MgSO₄, ad 1 l H₂O_{reinst} (pH 7.3)) werden 50 µl Bakterien gegeben und bei 37°C kultiviert bis eine optischen Dichte von OD_{600nm} = 0.5 erreicht ist. Dann wird die Kultur auf 100 ml mit TYM-Medium verdünnt und wiederum bis zu einer optischen Dichte von 0.5 kultiviert. Es folgt eine letzte Verdünnung auf ein Gesamtvolumen von 500 ml. Nachdem die OD_{600nm} einen Wert von 0.6 erreicht hat, wird die Bakterienkultur unter Schütteln in einem

NaCl-Eiswasserbad rasch abgekühlt und bei 4000xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 100 ml eiskaltem TfBI-Puffer (30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerol) gelöst und erneut zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml eiskaltem TfBII-Puffer (10 mM Na-MOPS (pH 7.0), 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerol) resuspendiert und portionsweise (200 µl) in vorgekühlte 1.5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Bakterien werden zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können dann bei -80°C gelagert werden.

5.1.8 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Überprüfung einer Ligation oder zur Vermehrung von Plasmid-DNA werden transformationskompetente *E. coli* *XL1 blue*-Bakterien transformiert. Dazu werden 100 µl Bakteriensuspension mit 100 ng Plasmid-DNA oder einem halben Ligationsansatz gemischt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 50 s. Dann werden die Bakterien direkt wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 700 µl LB- oder SOC-Medium werden sie 1 Stunde bei 37°C und 700 rpm geschüttelt. Dieser Zeitraum wird benötigt, um sich von dem Hitzeschock zu erholen und die durch das aufgenommene Plasmid erhaltene Antibiotikaresistenz auszubilden. Anschließend werden sie durch kurze Zentrifugation pelletiert und der Überstand bis auf einen Rest von 100 µl abgenommen. In diesen 100 µl werden die Bakterien wieder resuspendiert und auf einer Agar-Selektionsplatte (mit Antibiotikum) ausplattiert oder direkt in LB-Medium (mit Antibiotikum) überführt. Nun werden die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag können die auf der Agarplatte gewachsenen Klone weiter untersucht werden oder bei 4°C eine Woche gelagert werden. Die Flüssigkultur kann zur Plasmidisolation verwendet werden.

5.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Benötigt man eine große Menge eines Plasmids, kann man es in *E. coli* *XL1 blue* vervielfältigen. Dazu wird ein Klon oder ein Teil des Transformationsansatzes in 100-200 ml LB-Medium mit Antibiotika zur Selektion überimpft. Die Flüssigkultur wird über Nacht (12-16 h) bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Die Bakterien werden bei 4000xg und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Die Plasmid-DNA wird im Anschluss mit dem NucleoBond® Plasmid DNA Purification Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert. Das Bakterienpellet wird vorsichtig in 4 ml S1 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A)

resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml S2 Puffer (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) nach mehrmaligem Invertieren 2-3 Minuten bei RT lysiert. Die Zugabe von 4 ml S3-Puffer (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) und erneutes Invertieren bewirken, dass die genomische DNA ausflockt. Das Gemisch wird bei diesem Schritt 5 Minuten auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wird die Nukleobond-Säule mit 2.5 ml N2 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.3, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, 0.15% Triton X-100) equilibriert. Das Bakterienlysats wird durch Filtrierung von der ausgeflockten DNA und anderen Zelltrümmern befreit und auf die equilibrierte Säule gegeben. Die Säule wird mit 10 ml N3 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.3, 15% Ethanol, 1.15 M KCl) gewaschen und anschließend erfolgt die Elution der Plasmid-DNA mit 5 ml N5 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 15% Ethanol, 1 M KCl) in ein silanisiertes Corex-Röhrchen. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol gefällt, vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei 16000xg und 4°C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abkippen des Überstandes wird die DNA an der Luft getrocknet und dann in 50-100 µl sterilem H₂O_{reinst} aufgenommen.

5.1.10 Isolation von genomischer DNA aus 3T3-L1 Zellen

Die Isolation der genomischen DNA aus 3T3-L1 Zellen erfolgte mithilfe des GeneJET Genomic DNA Purification Kits der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Zellen einer 100 mm Schale werden, wie in 5.3.11 beschrieben, geerntet. Das Zellpellet wird in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss der Zellen werden 200 µl Lyse-Lösung und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben und das Gemisch für 10 Minuten unter leichtem Schütteln bei 56°C inkubiert. Zur Entfernung der RNA wird anschließend 20 µl RNase A-Lösung zugegeben und weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Untermischen von 500 µl 50%-igem Ethanol wird das Gemisch auf eine Säule gegeben und 1 Minute bei 6000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule wird durch Zugabe von 500 µl des Kit-internen Waschpuffers I und Zentrifugation für 1 Minute bei 8000xg gewaschen. Es folgt ein zweiter Waschschriff mit 500 µl des Kit-internen Waschpuffers II und dreiminütiger Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit (≥12000xg). Nach Überführung der Säule in ein frisches steriles 1.5 ml-Reaktionsgefäß werden 200 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT erfolgt die Elution durch Zentrifugation bei 8000xg für 1 Minute. Die isolierte DNA kann bei -20°C gelagert werden.

5.1.11 Herstellung eines dsDNA-Templates mittels Klenow-Fragment

Zur Herstellung der Sonde für den miRNA-Nachweis muss zuerst aus dem der miRNA entsprechenden Primer ein doppelsträngiges DNA-Template hergestellt werden. Dazu werden zunächst

- 2 µl miRNA-Primer (100 µM)
- 2 µl T7-Promotor-Primer
- 6 µl RNase-freies H₂O

gemischt und zur Denaturierung von Sekundärstrukturen 5 Minuten bei 70°C und anschließend nochmals 5 Minuten bei RT inkubiert. Zu dem Ansatz werden nun noch

- 2 µl 10x Klenow-Puffer
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 2 µl Klenow Fragment (10 U/µl)
- 4 µl RNase-freies H₂O

hinzu pipettiert, gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das so gebildete dsDNA-Template kann bei -20°C gelagert werden.

5.2 RNA-Techniken

5.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion

Die Phenol/Chloroform Extraktion ist eine schnelle und günstige Methode zur Isolation von RNA, DNA und Proteinen. Sie beruht auf dem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten der genannten Moleküle in einer Zwei-Phasen-Emulsion. Proteine reichern sich in der unteren organischen Phase, RNA in der oberen wässrigen Phase und die DNA im Grenzbereich an.

3T3-L1 Zellen werden in 60 mm (qRT-PCR) oder 100 mm Zellkulturschalen (miRNA-Nachweis) differenziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Dazu wird das Medium gründlich abgesaugt und die Zellen werden mit 1 ml (60 mm) oder 3 ml (100 mm) peqGOLD TriFast™ Reagenz durch Resuspendieren lysiert und in entsprechende frisch autoklavierte Reaktionsgefäße überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT werden die Proben bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Alle Proben einer Differenzierungsreihe werden gesammelt und zusammen aufgereinigt. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Milliliter zur Lyse eingesetztes TriFast™ Reagenz. Zu den aufgetauten Proben wird 200 µl Chloroform pipettiert. Anschließend wird das Gemisch 15 s kräftig geschüttelt und 3 bis 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei

12000xg und 4°C für 10 Minuten bei dem die Trennung in die beiden Phasen stattfindet. Die obere Phase wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der Rest bis zur späteren Weiterbearbeitung bei 4°C gelagert. Die Fällung der RNA wird durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol zur oberen Phase mit anschließender 10-minütiger (qRT-PCR) oder 30-minütiger (miRNA-Nachweis) Inkubation bei 4°C erreicht. Die RNA wird durch Zentrifugation bei 12000xg und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Anschließend wird das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Bei der Isolation der RNA für den miRNA-Nachweis entfallen diese Waschschrte, da sie die miRNA entfernen könnten. Das Pellet wird gründlich von überschüssiger Flüssigkeit befreit und wenige Minuten bei RT und geöffnetem Deckel getrocknet, bevor es in 30-50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert wird. Zur Verbesserung der Löslichkeit wird die RNA für 10 Minuten bei 55°C unter leichter Bewegung (200 rpm) inkubiert und anschließend erneut resuspendiert. Die gelöste RNA wird bei -80°C (langfristig) oder bei -20°C (kurzfristig) gelagert.

Da die DNA nicht benötigt wird, werden aus der unteren Phase nur die Proteine isoliert. Dazu wird zum restlichen Ansatz 300 µl Ethanol pipettiert, durch mehrmaliges Umdrehen gemischt und 2 bis 3 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird die DNA durch Zentrifugation bei 2000xg und 4°C für 15 Minuten entfernt und der Überstand in zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu jedem Ansatz gibt man zur Fällung der Proteine 750 µl Isopropanol, mischt und inkubiert 10 Minuten bei RT. Die gefällten Proteine werden bei 12000xg und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Die Pellets werden dreimal mit je 1 ml Protein-Waschpuffer (0.3 M Guanidin-HCl in 95% Ethanol) und anschließend einmal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrten werden die Pellets jeweils für 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschschrte wird die überschüssige Flüssigkeit gründlich entfernt und die Pellets mit geöffnetem Deckel mehrere Minuten bei RT getrocknet. Die getrockneten Pellets werden in 50-100 µl Protein-Extraktionspuffer (8 M Harnstoff, 200 mM NaCl, 47.4 mM Na₂HPO₄, 2.6 mM NaH₂PO₄, frisch dazu: 50 mM DTT) resuspendiert und 1 Stunde bei RT inkubiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wird die Proteinlösung 3 Minuten bei 100°C inkubiert, direkt gefolgt von 3 x 30 s Ultraschallbehandlung im Eiswasserbad. Dies kann bei Bedarf mehrmals wiederholt werden. Abschließend erfolgt ein Zentrifugationsschrte bei 10000xg und 4°C für 10 Minuten, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit A. deion. verdünnt. Nun kann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

5.2.2 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (Harnstoff-PAGE)

Die Harnstoff-PAGE ist eine gelelektrophoretische Methode zur Auftrennung einzelsträngiger DNA- oder RNA-Gemische mit einer Länge von maximal 500 Nukleotiden. Der hohe Harnstoffgehalt des Gels (7.5 M) stellt dabei sicher, dass die Nukleinsäuren in der denaturierten Form ohne Sekundärstrukturen vorliegen. Die Polyacrylamidmatrix sorgt dafür, dass sich die negativ geladenen Nukleinsäuren nach Anlegung eines elektrischen Stroms der Größe nach in Richtung der Anode auftrennen. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große, da sie besser durch die Poren passen. Die verwendete Polyacrylamidkonzentration richtet sich nach der Länge der zu untersuchenden Nukleinsäure.

Die zum Gießen des Gels verwendeten Glasplatten (24x16.5 cm) und "Spacer" (1.5 mm) werden gründlich mit Ethanol gereinigt, zusammengebaut und mit 2%-iger Agarose abgedichtet. Zum Nachweis von miRNAs wird ein 12%-iges Harnstoff-Polyacrylamidgel verwendet. Dazu pipettiert man folgende Substanzen in ein 50 ml Röhrchen:

- 24 ml Urea-Konzentrat
- 21 ml Urea-Verdünnung
- 5 ml Urea-Puffer
- 400 µl APS
- 20 µl TEMED

Die Lösung wird zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. Wenn das Gel auspolymerisiert ist, kann es gleich verwendet oder in feuchten Tüchern eingeschlagen bei 4°C gelagert werden. Zur Gelelektrophorese wird das Gel in die Elektrophorese-Apparatur gespannt und die Pufferbehälter mit 1xTBE (89 mM Tris, pH 8.3, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂EDTA) befüllt. Die Taschen werden ausgespült und die Luftblasen am unteren Rand des Gels entfernt. Bevor die Proben geladen werden erfolgt ein Vorlauf bei 15 W für 10 Minuten. Die RNA-Proben werden mit RNA-Ladepuffer II (750 µl Formamid, 150 µl 5x MSE-Puffer, 240 µl Formaldehyd, 200 µl 50% Glycerol, je eine Spatelspitze Bromphenolblau und Xylen-Cyanol FF, 160 µl H₂O_{reinst}) versetzt und nach erneutem Ausspülen in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der RNA erfolgt bei 20 W für 2.5-4 h. Anschließend kann die RNA mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

5.2.3 Northern Blot

Nach der Harnstoff-PAGE wird die aufgetrennte RNA mittels Semidry-Blotverfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu verwendet man folgenden Aufbau:

Anode
5 Blatt Whatman-Papier
Nylonmembran
Harnstoff-Polyacrylamidgel
5 Blatt Whatman-Papier
Kathode

Vor jedem weiteren Schritt wird die vorherige Lage mit A. deion. gewässert. Der Transfer erfolgt bei 15 V für 30 Minuten.

5.2.4 Radioaktiver miRNA-Nachweis

Die auf die Nylonmembran geblottete RNA kann mittels spezifischer, radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen werden. Nach dem Blotten muss die RNA zunächst durch chemisches Verknüpfen (Crosslinken) kovalent an die Nylonmembran gebunden werden. Dazu werden 3 Blatt Whatman-Papier mit Crosslinking-Puffer (245 µl Methylimidazol, 0.75 g EDC-Hydrochlorid, ad 24 ml H₂O_{reinst}) getränkt, die Membran daraufgelegt und beides mit Frischhaltefolie umwickelt. Die Vernetzung erfolgt für 1-2 h bei 55°C im Rotationsofen. Anschließend wird die Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre überführt und mit dem vorgewärmten Hybridisierungspuffer (7.5 ml 20x SSC, 0.6 ml Na₂HPO₄, 21 ml 10% SDS, 0.6 ml 50x Denhardt's Lösung, eine Spatelspitze Blockreagenz) während der Sondenherstellung bei 50°C prähybridisiert. Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde werden

7 µl RNase-freies H₂O
1 µl dsDNA-Template
2 µl 10x T7 RNA-Polymerase-Puffer
3 µl NTPs (ohne U, je 10 mM)
2 µl T7 RNA-Polymerase (50 U/µl)
5 µl [³²P]-α-UTP (10 µCi/µl)

gemischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl DNase I (2 U/µl) zum Verdau des Templates zugegeben und wiederum 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Der komplette Ansatz wird in den Hybridisierungspuffer gegeben und die Anlagerung der Sonde an die miRNA findet über Nacht bei 6 Umdrehungen/Minute und 50°C im Rotationsofen

statt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden oder Radioaktivität von der Nylonmembran, wird sie am nächsten Tag zweimal 15 Minuten mit je 30 ml Hochsalzpuffer (5x SSC, 1% (w/v) SDS) und zweimal 15 Minuten mit je 30 ml Niedrigsalzpuffer (1x SSC, 1% (w/v) SDS) gewaschen. Anschließend wird die Membran getrocknet und das radioaktive Signal wird mittels Phosphor Imaging-Platte auf dem Typhoon-Trio Imager detektiert. Mit Hilfe der Software Image Quant können die erhaltenen Signale quantifiziert werden.

Durch Strippen der Membran ist es möglich, die radioaktiv markierte Sonde zu entfernen ohne die RNA ebenfalls zu entfernen. Dadurch können die Expressionsmuster mehrerer miRNAs auf einer Membran untersucht werden. Dazu wird die Membran für 2-3 h in 30 ml Stripping-Puffer (0.05 mM Tris, 0.2 mM EDTA, 0.05% (v/v) Natriumpyrophosphat, 0.1x Denhardt's Lösung) bei 70°C im Rotationsofen inkubiert. Anschließend erfolgt die Prähybridisierung und Hybridisierung mit der neuen radioaktiv markierten Sonde wie bereits beschrieben.

5.2.5 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT) *real time* PCR

Die qRT-PCR ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von RNA-Molekülen in Echtzeit (real time), d.h. während der PCR. In dieser Arbeit wird sie dazu verwendet, die Genexpression auf dem Niveau der mRNA zu untersuchen. Dazu wird ein definierter Bereich der mRNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die Amplifikation der cDNA in der anschließenden PCR wird mittels DNA-interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Für die qRT-PCR wird das QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei handelt es sich um ein "One-Step" System, das die reverse Transkription und die anschließende PCR ohne Unterbrechung ermöglicht, da im anfänglichen Reaktionsansatz schon alle benötigten Enzyme enthalten sind. Als Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR Green I enthalten, dessen Signal nach jeder Elongationsphase gemessen wird. SYBR Green interkaliert in dsDNA und bildet mit dieser einen fluoreszierenden Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 521 nm. Ein Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 1 µl RNA-Template (50 ng/µl)
- 0.8 µl Primer-Set (forward & reverse gemischt, je 25 µM)
- 10 µl 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
- 0.2 µl QuantiTect RT Mix
- 8 µl RNase-freies H₂O

Zur Angleichung der Proben wird für jedes RNA-Template ein eigener Mastermix bestehend aus allen Komponenten außer dem Primer-Set angesetzt. Dies stellt sicher dass in jeder Probe die gleiche Menge an RNA enthalten ist. Das Primer-Set wird erst nach Verteilung des Mastermixes zu den einzelnen Ansätzen gegeben.

Die qRT-PCR wird mit einem LightCycler® der Firma Roche durchgeführt, der 32 parallele Ansätze pro Lauf ermöglicht. Der Lauf findet unter folgenden Bedingungen statt:

20 Minuten	50°C	reverse Transkription	
15 Minuten	95°C	initiale PCR Aktivierung	
15 Sekunden	94°C	Denaturierung	} 35-45 Wiederholungen
20 Sekunden	60°C	Primer-Anlagerung	
30 Sekunden	72°C	Elongation	

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wird im Anschluss an die qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dies dient zum Nachweis einer erfolgreichen PCR, bei der pro Primer-Set nur ein spezifisches Produkt entstehen sollte. Dazu wird der Reaktionsansatz um 0.1°C/s von 65°C bis 99°C erwärmt, wodurch die DNA denaturiert und das Fluoreszenzsignal abnimmt. Je höher der GC-Gehalt des PCR-Produkts desto höher die Schmelztemperatur. Besitzen alle PCR-Produkte des gleichen Primer-Sets die gleiche Schmelztemperatur und wurde nur ein Produkt gebildet gilt die PCR als auswertbar.

Die Auswertung erfolgt nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode: Für jeden Lauf wird ein individueller Fluoreszenzschwellenwert festgelegt, der für alle Proben gleich ist und der als "Cycle threshold" (C_t) bezeichnet wird. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die eine Probe benötigt, um diesen Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen bestimmt die relative mRNA-Menge der Probe und stellt gleichzeitig ihren C_t -Wert dar. Der C_t -Wert der Probe wird auf den C_t -Wert eines Kontrollgens normiert, das benötigt wird, um eine Abweichung der eingesetzten RNA-Menge zwischen verschiedenen Proben auszugleichen. In dieser Arbeit dient die 18S ribosomale RNA (rRNA) als Kontrolle. Zunächst wird vom C_t -Wert der Probe der C_t -Wert der Kontrolle abgezogen ($C_{t_{\text{Probe}}} - C_{t_{\text{Kontrolle}}}$). Dadurch erhält man den ΔC_t -Wert. Die ΔC_t -Werte der verschiedenen Proben werden wiederum auf eine Probe normiert (Referenzprobe, hier: D0). Dazu wird vom ΔC_t -Wert der Probe der ΔC_t -Wert der Referenzprobe abgezogen ($\Delta C_{t_{\text{Probe}}} - \Delta C_{t_{\text{Referenzprobe}}}$), wodurch man den $\Delta\Delta C_t$ -Wert erhält. Aus dem $\Delta\Delta C_t$ -Wert kann nun die n-fache Expression der mRNA durch die Formel $n = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet werden. Man verwendet die Zweierpotenz, da sich die DNA in der exponentiellen Phase der PCR mit jedem Zyklus verdoppelt.

5.3 Zellkulturtechniken

5.3.1 Isolation der Zellen

Die Isolation der hMSC erfolgte im Fraunhofer Institut in St. Ingbert. Die Zellen werden aus dem Knochenmark des Hüftkopfes (*Caput femoris*) von Patienten, die eine Hüftendoprothese erhalten haben, isoliert. Nach der Zerkleinerung der Knochenfragmente werden die isolierten Zellen in α -MEM gesammelt. Die mononukleären Zellen werden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation bei 350xg für 30 Minuten von den restlichen Zellen getrennt, gewaschen und in Kulturmedium (α -MEM + 15% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin) ausgesät. Bevor sie für Versuche verwendet werden, wird ihr Stammzellcharakter überprüft. Dieser setzt die Expression der Oberflächenmarker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 und HLA-ABC, sowie die fehlende Expression von CD34, CD45, CD133 und HLA-DR voraus. Zusätzlich dazu wird ihre Fähigkeit zur adipogenen und osteogenen Differenzierung überprüft.

Die Isolation der SVZ-Zellen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schäfer in Zweibrücken. Dazu werden die Gehirne von zwei bis fünf Tage alten Balb/c Mäusen isoliert und zügig in kaltes MEM-Hepes Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin überführt. Die SVZ Regionen beider Gehirnhälften werden separiert und in 1 ml Accutase-Lösung gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen vorsichtig je dreimal durch eine 23 G und eine 27 G-Kanüle gepresst. Anschließend werden die Zellen bei 120xg für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Proliferationsmedium (DMEM/F12 + 1% BSA, 2% B27 Supplement ohne Retinsäure, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.1% β -Mercaptoethanol, 20 ng/ml FGF und 10 ng/ml EGF) resuspendiert und die Zellzahl wird bestimmt. Pro 25 cm² Zellkulturflasche werden 5x10⁵ Zellen ausgesät.

5.3.2 Kultivieren der Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinien 3T3-L1 und HCT116 findet in 100 mm Zellkulturschalen der Firma Greiner statt. Als Nährmedium für die 3T3-L1 Zellen wird DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit L-Glutamin und 5 g Glucose/l verwendet, dem pro 400 ml Flasche 10% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt werden. Damit die Zellen ihr Differenzierungspotential nicht verlieren, muss darauf geachtet werden, sie regelmäßig vor Erreichen der Konfluenz zu passagieren. Die HCT116 Zellen benötigen als Nährmedium McCoy's 5A mit L-Glutamin und ebenfalls 10% FCS.

Die hMSC wachsen ebenfalls in adhärenenter Form und werden in 175 cm² Zellkulturflaschen

der Firma Greiner kultiviert. Als Nährmedium benötigen sie α -MEM, dem 15% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugesetzt werden. Sie müssen passagiert werden sobald sie 70-80% Konfluenz erreicht haben und werden dann mit einer Dichte von 1×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung und Differenzierung der hMSC wurde zum Teil im Fraunhofer-Institut von Frau Dr. Nadine Wilhelm durchgeführt.

Die Kultivierung der SVZ-Zellen erfolgt in 25 cm² Zellkulturflaschen im Nährmedium DMEM/F12 mit den Zusätzen: 1% BSA, 2% B27 Supplement ohne Retinsäure, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.1% β -Mercaptoethanol, 20 ng/ml FGF und 10 ng/ml EGF (Proliferationsmedium). Die Zellen werden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/25cm² Flasche ausgesät, für 5 Tage kultiviert und anschließend für die Differenzierungsexperimente ausgesät. Während der Proliferationsphase wachsen sie als dreidimensionale Sphären in einer Suspensionskultur und erst bei Differenzierungsbeginn werden sie adhärent. Die komplette Kultivierung und Differenzierung der SVZ-Zellen wurde in Zweibrücken von Frau Melanie Bender und Frau Monika Martin durchgeführt.

Alle Zellen werden bei konstanten 37°C, sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern, werden alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.3.3 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der 3T3-L1- und HCT116 Zellen wird das Medium zunächst abgesaugt. Die Zellen werden bei Raumtemperatur kurz mit 1 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) inkubiert, dann saugt man das Trypsin wieder ab. Die Zellen werden mit dem verbliebenen Trypsin/EDTA für wenige Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das EDTA (Ca²⁺-Chelator) chelatiert die für die Zell-Zell-Bindung wichtigen Ca²⁺-Ionen, die Protease Trypsin (0.1%) löst die Zellen aus ihrem Verband, indem sie die Proteinverbindungen zwischen den Zellen und die zum Gefäßboden spaltet. Mit frischem Zellmedium werden die gelösten Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren gemischt und in geringerer Menge in neue Kulturgefäße ausgesät. Die 3T3-L1 Zellen werden in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20 und die HCT116 Zellen 1:4 bis 1:10 verdünnt ausgesät.

Zum Passagieren der hMSC werden 5 ml Trypsin/EDTA verwendet. Dieses verbleibt wenige Minuten bei 37°C im Brutschrank auf den Zellen. Nach mikroskopischer Überprüfung der Ablösung werden die Zellen in α -MEM (ohne Zusätze) aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und 7 Minuten bei 250xg abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml

komplettiertem Medium resuspendiert, die Zellzahl wird bestimmt und die Zellen werden entweder zur weiteren Kultivierung oder zur Differenzierung ausgesät.

Die SVZ-Zellen werden nicht mit Trypsin/EDTA, sondern mit Accutase-Lösung vereinzelt. Dazu werden die Neurosphären pelletiert, in 1 ml Accutase-Lösung aufgenommen und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension vorsichtig je dreimal durch 23 G und 27 G-Kanülen gezogen. Die nun vereinzelter Zellen werden erneut durch 5-minütige Zentrifugation bei 120xg pelletiert und das Pellet in Proliferationsmedium resuspendiert. Die Zellen können nun gezählt und für die gewünschten Experimente ausgesät werden.

5.3.4 Differenzierung der Zellen

Die 3T3-L1 Zellen werden auf 60 mm oder 100 mm Zellkulturschalen in DMEM-Medium (5 g Glukose/l) mit 10% FCS ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wird das Nährmedium durch den Differenzierungsmix I (DMEM (25 g Glucose/l) + 10% FCS, 0.5 mM IBMX, 0.25 µM Dexamethason, 5 µg/ml Insulin) ersetzt. Dieser Zeitpunkt wird als "Tag 1 der Differenzierung" bezeichnet. Der Differenzierungsmix I wird an Tag 3 oder 4 der Differenzierung erneuert. Ab Tag 6 der Differenzierung erhalten die Zellen den Differenzierungsmix II (DMEM (25 g Glukose/l) + 10% FCS, 5 µg/ml Insulin), der alle zwei bis drei Tage erneuert wird. An Tag 12 ist die Differenzierung abgeschlossen.

Zur Einleitung der adipogenen Differenzierung der hMSC, werden sie mit einer Dichte von 15000 Zellen/cm² in ihrem normalen Nährmedium ausgesät. Sobald die Zellen konfluent sind wird das Nährmedium durch den Differenzierungsmix (α-MEM, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 500 µM IBMX, 100 nM Dexamethason, 200 µM Indomethacin und 100 ng/ml Insulin) ersetzt, der alle drei Tage erneuert wird. Zur kompletten Ausbildung des adipogenen Differenzierungstyps benötigen die hMSC 21 Tage.

Die Differenzierung der SVZ-Zellen wird durch die Zugabe von 20 µM Retinsäure zum Proliferationsmedium induziert. Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen werden die Deckgläschen zusätzlich dazu mit extrazellulären Matrix-Proteinen (ECM-Gel, Sigma, 1:100) beschichtet. Das Medium wird alle drei Tage erneuert. Eine komplette Differenzierung der SVZ-Zellen dauert 3-4 Wochen, nach 5 Tagen sind jedoch schon ausreichend viele Zellen differenziert, weshalb die meisten Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt stattfinden.

5.3.5 Behandlung der Zellen mit CK2-Inhibitoren

Zur Behandlung der Zellen mit den CK2-Inhibitoren CX-4945 und Quinalizarin werden die Hemmstoffe in der gewünschten Konzentration in den entsprechenden Medien in sterilen 15 ml bzw. 50 ml Röhrchen gelöst. Das Medium der zu behandelnden Zellen wird abgesaugt und durch das Hemmstoff-haltige Medium ersetzt. Bei jedem Mediumwechsel wird auch die Hemmstoff-Behandlung erneuert. Die DMSO-Kontrolle enthält die äquivalente DMSO-Menge zur eingesetzten Hemmstoffmenge.

5.3.6 Tauen von Zellen

Die gefrorenen Zellen werden so schnell wie möglich in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Unter ständigem vorsichtigem Mischen erfolgt eine tropfenweise Zugabe von 10 ml des kalten Nährmediums (ohne Zusätze), um die hohe DMSO-Konzentration stufenweise zu verdünnen. Die Zellen werden 7 Minuten bei 250xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Nährmedium (mit Zusätzen) resuspendiert. Die Zellen werden dann in eine Kulturschale der entsprechenden Größe überführt und unter normalen Bedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wird das Kulturmedium erneuert, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

5.3.7 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren der Zellen sollte möglichst zügig durchgeführt werden, um ein Stressen der Zellen zu vermeiden. Es werden im Vorfeld zwei Medien angesetzt: Medium (ohne Zusätze) plus die 4-fache Menge an FCS bezogen auf die Menge im Kultivierungsmedium und Medium (ohne Zusätze) plus 20% DMSO. Pro Einfrierröhrchen werden 0.75 ml von jedem Medium angesetzt und auf Eis vorgekühlt. Die hohen Mengen an FCS und DMSO erhöhen die Überlebensrate der Zellen beim Auftauen. Die Zellen werden abtrypsiniert und in wenigen Millilitern kaltem Medium (ohne Zusätze) resuspendiert. Nach Überführung in ein vorgekühltes 50 ml Röhrchen werden die Zellen bei 250xg und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden auf Eis in der entsprechenden Menge an Medium plus FCS resuspendiert ohne die Pipette vorher abzuflammen. Nun wird die gleiche Menge an Medium plus DMSO unter Schütteln tropfenweise zugegeben. Pro Einfrierröhrchen werden 1.5 ml der Zellsuspension abgefüllt, gut verschlossen und in das Einfriergefäß (CoolCell) überführt. Das Einfriergefäß wird über Nacht bei -80°C gelagert. Ein Metallring im Innern des Gefäßes sorgt dafür, dass die Zellen gleichmäßig um 1°C pro Minute

heruntergekühlt werden, was die schonendste Einfriermethode darstellt. Am nächsten Tag werden die Röhrchen zügig in ein ausgewähltes Fach des Kryotanks überführt und können dort in Flüssigstickstoff bei -196°C über längere Zeit gelagert werden.

5.3.8 Beseitigung von Kontaminationen

Eine Behandlung von Kontaminationen in der Zellkultur ist nur dann sinnvoll, wenn es sich um wichtige Zellen handelt. Bei entbehrlichen Zellen ist eine Entsorgung sinnvoller, um die Gefahr der Übertragung auf andere Zellen zu umgehen. Wurde bereits ein Experiment begonnen, wie z.B. eine Differenzierung, kann auf die Ergebnisse nicht vertraut werden, da die Kontamination einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zelle haben könnte.

Bakterielle Kontamination

Man versucht zunächst durch Spülen der Zellen mit sterilem 1xPBS (pH 7.4) möglichst viele Bakterien wegzuwaschen. Dann werden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 7 Minuten bei 100xg zentrifugiert. Durch die verringerte Zentrifugationsgeschwindigkeit verbleiben die leichteren Bakterien im Überstand. Dieser wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Nährmedium mit 1:100 verdünntem Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) resuspendiert und ausgesät.

Hefe-/Pilzkontamination

Bei Hefe- oder Pilzkontaminationen wird der Befall entfernt und dem frischen Nährmedium wird das Antimykotikum Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$) in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt.

5.3.9 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer mit dem Kammerfaktor 10^4 verwendet. Von den trypsinierten und in Kulturmedium resuspendierten Zellen werden 20 μl entnommen und mit der gleichen Menge an Trypanblau-Lösung (0.4% (w/v) Trypanblau in 1xPBS) gemischt (Verdünnungsfaktor 2). Trypanblau kann die Membran toter Zellen passieren und färbt diese blau. Nachdem das Gemisch luftblasenfrei zwischen Zählkammer und Deckglas gegeben wurde (ca. 10 μl), werden die lebenden Zellen in den äußeren vier Quadranten ausgezählt. Die erhaltenen Zahlen werden gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert. Dadurch erhält man die Lebendzellzahl pro Milliliter.

5.3.10 Transiente Transfektion von Zellen

Das Einbringen von fremder DNA in eukaryonte Zellen bezeichnet man als Transfektion. Man unterscheidet die transiente Transfektion, die ein Konstrukt nur vorübergehend für bis zu 96 h einbringt, von der stabilen Transfektion, bei der die eingebrachte DNA dauerhaft in die genomische DNA integriert wird. Die eukaryonte Membran ist normalerweise undurchlässig für DNA. Um dies zu umgehen werden spezielle chemische, physikalische oder biologische Verfahren benötigt. Die hier verwendeten Transfektionsreagenzien FuGENE® HD und Viafect™ basieren auf dem Prinzip der chemischen Transfektion. Genaue Angaben der Hersteller bezüglich der Zusammensetzung gibt es nicht, aber in der Regel handelt es sich um Gemische kationischer Lipide, die mit der negativ geladenen DNA komplexieren und per Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Diese Art der Transfektion wird auch als Lipofektion bezeichnet. In dieser Arbeit wird FuGENE® HD zur transienten Transfektion von HCT116 Zellen und Viafect™ zur transienten Transfektion von 3T3-L1 Zellen verwendet.

Die HCT116 Zellen werden subkonfluent (60-70%) ausgesät, d.h. pro 24-Loch-Platte sät man 1.5×10^6 Zellen und pro 100 mm Zellkulturschale 4×10^6 Zellen aus. Am nächsten Tag findet die Transfektion statt. Die Plasmid-DNA wird dazu in McCoy's 5A-Medium (ohne Zusätze) verdünnt, bevor man FuGENE® HD im Verhältnis 2.5:1 zugibt ohne den Rand des Reaktionsgefäßes zu berühren. Man inkubiert den Ansatz 5 Minuten bei RT und gibt ihn dann tropfenweise in das Kulturmedium der Zellen. Die Zellen werden nach 24 h geerntet oder fixiert. Erfolgt eine Behandlung mit einem CK2-Inhibitor wird das Medium 6 h nach der Transfektion durch das Hemmstoff-haltige Medium ersetzt und die Zellen weitere 18 h darin kultiviert. Bei einer Transfektion mit mehreren Expressionsplasmiden werden diese im Verhältnis 1:1 verwendet ohne dass sich die Gesamt-DNA-Menge ändert.

Für die Reporteranalysen in den 3T3-L1 Zellen werden diese in einer Menge von $1.5-2 \times 10^4$ Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen transfiziert. Die Plasmid-DNA, bestehend aus pGL4.70[hRluc] und pGL4.10-LV bzw. pGL4.10-PPAR γ 2 im Verhältnis 1:10, werden in DMEM-Medium (ohne Zusätze) gelöst. Nach der Zugabe von Viafect™ wird der Ansatz 10 Minuten bei RT inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Nach 16 h wird das Kulturmedium durch den Differenzierungsmix I ersetzt, in dem zuvor DMSO oder die CK2-Inhibitoren gelöst wurden.

Tabelle 18 gibt einen Überblick über die genaue Zusammensetzung der Transfektionsansätze.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Transfektionsansätze

Transfektions-reagenz	Zellkulturgefäß	Menge Plasmid-DNA [µg]	Medium (ohne Zusätze)	Menge Transfektions-reagenz [µl]
FuGENE® HD	24-Loch-Platte	0.5	25	1.25
	100 mm Schale	8	400	20
Viafect™	24-Loch-Platte	0.5	50	1.5

5.3.11 Ernten von Zellen

Falls nicht anders angegeben werden die Zellen zweimal mit kaltem 1xPBS (pH 7.4) gewaschen und anschließend in einer geringen Menge an 1xPBS (1-2 ml) mit einem Gummischaber von der Platte gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend werden die Zellen durch eine 7-minütige Zentrifugation bei 250xg und 4°C pelletiert. Die Zellen können entweder direkt zum Zellaufschluss verwendet werden oder für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C oder -80°C gelagert werden.

Die differenzierten SVZ-Zellen werden durch die Inkubation mit Accutase vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Nach Zentrifugation bei 120xg und 4°C werden die Zellpellets bis zum Aufschluss bei -80°C gelagert.

5.3.12 Oil Red O-Färbung

Mit Hilfe des fettlöslichen Azofarbstoffs Oil Red O können die Triacylglycerid-haltigen Lipidtröpfchen der reifen Adipozyten angefärbt werden. Dies wird am letzten Tag der Differenzierung durchgeführt, also bei 3T3-L1 Zellen an Tag 12 und bei hMSC an Tag 21. Die Zellen werden zweimal vorsichtig mit 1xPBS (pH 7.4) gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit 3.7% (v/v) Formaldehyd in 1xPBS (pH 7.4) fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 1xPBS (pH 7.4) werden die Zellen 60 Minuten mit der Oil Red O-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Zur Herstellung der Oil Red O-Lösung werden 0.5% (w/v) Oil Red O in Isopropanol gelöst und im Verhältnis 3:2 mit H₂O_{reinst} verdünnt. Nach zehnminütiger Inkubation wird die Lösung durch einen Whatman Filter filtriert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Die filtrierte Lösung kann dann verwendet werden. Nach der Färbung werden die Zellen dreimal mit A. deion. gewaschen und können dann mikroskopiert werden. Der eingelagerte Farbstoff kann mittels Isopropanol erneut eluiert und durch Messung der Absorption bei 515 nm quantitativ bestimmt werden. Als Referenz dienen 3T3-L1 Zellen, die über 12 Tage in regulärem Nährmedium kultiviert wurden, also undifferenziert sind.

5.4 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden

5.4.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Proteinanalyse

Das Zellpellet wird in 30-200 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS) mit Proteaseinhibitor Complete™ (1:25) und bei Bedarf Phosphataseinhibitor PhosSTOP (1:10) resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension 3 x 30 Sekunden mit je 30 Sekunden Pause bei 35 kHz in einem Ultraschallbad vollständig aufgeschlossen. Zur Abtrennung von unlöslichen Zellbestandteilen erfolgt anschließend ein Zentrifugationsschritt bei 16100xg und 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss kann der Gesamtzellextrakt direkt zur Proteinquantifikation verwendet werden oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert werden.

5.4.2 Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten zur Proteinanalyse

Zur Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA geerntet. Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen im Brutschrank für zwei Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend mit Medium (ohne Zusätze) resuspendiert und in ein 15 oder 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen werden für 5 Minuten bei 2800xg und 4°C abzentrifugiert, mit 1xPBS (pH 7.4) gewaschen und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Zelllysepuffer A (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, frisch dazu: 0.5 mM DTT) mit Proteaseinhibitor Complete™ (1:25) und bei Bedarf Phosphataseinhibitor PhosSTOP (1:20) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 2800xg und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand enthält die cytosolischen Proteine und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wird mit der halben Menge an Zelllysepuffer A gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand diesmal verworfen wird. Die verbliebenen Zellkerne werden in Kernlysepuffer C (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, frisch dazu: 0.5 mM DTT, 450 mM NaCl) mit Complete™ (1:25) und PhosSTOP (1:10) resuspendiert und 20 Minuten unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert. Mit Hilfe einer Spritze wird das Gemisch anschließend je fünfmal durch eine 21 G- und eine 23 G-Kanüle gezogen. Durch die darauf folgende Zentrifugation bei 16100xg und 4°C für 30

Minuten werden unlösliche Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand (Zellkernextrakt) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend können Cytoplasma- und Zellkernextrakt direkt zur Proteinquantifikation verwendet werden oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die verwendete Puffermenge ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Menge an Lysepuffer in Abhängigkeit der Zellkulturschalengröße

Zellkulturschale	Zellysepuffer A [μl]	Kernlysepuffer C [μl]
100 mm	300	100
145 mm	1000	300

5.4.3 Proteinquantifikation nach Bradford

Die Proteinquantifikation nach Bradford basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blau G250 nach Bindung an Proteine im sauren Milieu. Der Farbstoff bindet dabei an kationische und unpolare Aminosäuren und wird dadurch in seiner anionischen Form stabilisiert. Diese besitzt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm (blau), wohingegen die ungebundene kationische Form bei 470 nm (rot) absorbiert. Die Proteinquantifikation erfolgt durch photometrische Messung der Absorption bei 595 nm.

Die Ansätze werden in 1.5 ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Dazu pipettiert man 1 μl des Proteingemischs in das Reaktionsgefäß und gibt 1 ml der Farblösung, bestehend aus 800 μl A. deion. und 200 μl Bradford-Reagenz, dazu. Der Ansatz wird gemischt und in eine Halbmikroküvette gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wird die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Leerwert dient 1 ml Farblösung mit 1 μl des Puffers, in dem die Proteine gelöst sind. Von jeder Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit Hilfe einer Rinder-IgG-Eichkurve lässt sich die Proteinkonzentration der Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnen.

5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Analog zur Harnstoff-PAGE (siehe 5.2.2) handelt es sich bei der SDS-PAGE um eine elektrophoretische Methode zur Auftrennung von Proteinen. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass sie nach Anlegung einer Spannung allein der Größe nach aufgetrennt werden. Durch Zusatz von Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol, die Disulfidbrücken reduzieren können, und Erhitzen auf 95°C werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst, was die gleichmäßige Anlagerung des SDS und somit eine bessere Auftrennung fördert.

Zur Entfernung von Verunreinigungen werden alle Teile der Gelkammer mit Ethanol gereinigt und anschließend zusammengebaut. Die Kammer wird zu circa 75% mit Trenngel befüllt, das mit Isopropanol überschichtet wird. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das überschüssige Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Anschließend werden unverzüglich die Kämme eingesetzt. Sobald das Sammelgel ausgehärtet ist, werden die Kämme entfernt, die Gele in feuchte Tücher eingeschlagen und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Sammel- und Trenngel unterscheiden sich in Porengröße, Salzkonzentration und pH-Wert, was zu einem Stapelungseffekt am Gelübergang führt, wodurch die Proteinbanden schärfer werden. Beide Gele enthalten die kommerzielle Acrylamid-Stammlösung (Gellösung A: 30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid), die die Porengröße bedingt. Das Sammelgel besitzt immer eine Polyacrylamidkonzentration von 4.3%, wohingegen das Trenngel, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, zwischen 7.5 und 15%-ig sein kann. Die Salzkonzentration und den pH-Wert bestimmen Gellösung B (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 14 mM SDS) für das Trenn- und Gellösung C (495 mM Tris-HCl, pH 6.8, 14 mM SDS) für das Sammelgel. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Gele.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels

	Trenngel				Sammelgel
c[Polyacrylamid]	7.5%	10%	12.5%	15%	4.3%
Gellösung A [ml]	9	12	15	18	2.2
Gellösung B [ml]	9	9	9	9	-
Gellösung C [ml]	-	-	-	-	3.8
A. deion. [ml]	18	15	12	9	9
APS [µl]	200	200	200	200	100
TEMED [µl]	20	20	20	20	40

c: Konzentration, APS: Ammoniumpersulfat, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Den aufzutrennenden Proteingemischen (gleiche Mengen) wird SDS-Probenpuffer zugesetzt, die Proben werden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels geladen. Die Auftrennung erfolgt bei 25 mA pro Gel für 1–1.5 Stunden bis die Lauffront am unteren Rand des Gels angelangt ist. Zur späteren Größenabschätzung wird ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt.

5.4.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Für die Färbung der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine verwendet man ein Gemisch aus Coomassie Brilliant Blau R250 und G250. Das SDS-Polyacrylamidgel wird 15 Minuten in der Coomassie-Blau-Färbelösung (0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250, 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250, 50% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt. Anschließend wird die überschüssige Färbelösung mit A. deion. entfernt und das Gel so lange mit der Entfärbelösung (10% Eisessig, 20% Methanol, 70% H₂O_{reinst}) auf dem Schüttler inkubiert, bis der Hintergrund soweit entfärbt ist, dass die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

5.4.6 Western Blot Analyse

Die Übertragung der im SDS-Polyacrylamid aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran (Nitrocellulose oder PVDF) wird als Western Blot bezeichnet. Auch hier macht man sich die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld zunutze. Im Gegensatz zum Northern Blot (siehe 5.2.3) erfolgt der Western Blot mittels Tank Blot Verfahren. Der Aufbau verläuft nach folgendem Schema:

Kathode
Schwamm
3 Blatt Whatman-Papier
SDS-Polyacrylamidgel
PVDF-Membran
3 Blatt Whatman-Papier
Schwamm
Anode

Die PVDF-Membran muss vor Benutzung in Methanol aktiviert werden. Die Schwämme und die Whatman-Papiere werden mit 1x Transferpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM Glycin) angefeuchtet. Die Proteine werden entweder bei 200 mA für 4 Stunden oder bei 100 mA über Nacht transferiert.

5.4.7 Anfärbung von phosphorylierten Proteinen

Mit Hilfe des Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kits der Firma Molecular Probes lassen sich phosphorylierte Proteine nach dem Transfer auf die PVDF-Membran anfärben. Der Farbstoff bindet dabei spezifisch, jedoch nicht kovalent an die Phosphatgruppe der

phosphorylierten Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Die Detektion des Farbstoffs erfolgt durch seine Eigenfluoreszenz, die ein Anregungsmaximum bei 555 nm und ein Emissionsmaximum bei 580 nm besitzt.

Nach dem Transfer wird die PVDF-Membran an der Luft getrocknet. Anschließend wird sie mit Methanol reaktiviert und die Proteine auf der Membran fixiert, indem man die Membran mit der Proteinseite nach unten 10 Minuten in 25 ml Fixierlösung (7% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol) schwenkt. Es folgen vier Waschschrte mit 25 ml A. deion. für jeweils 5 Minuten, bevor die Membran für 15 Minuten in 25 ml der Pro-Q®-Färbelösung (25 µl Pro Q® Diamond Blot Stain Reagent in 25 ml Pro Q® Diamond Blot Stain Buffer) inkubiert wird. Zur Entfernung der überschüssigen Färbelösung wird die Membran danach dreimal je 5 Minuten mit 30 ml der Entfärbelösung (50 mM Natriumacetat, pH 4.0, 20% Acetonitril) gewaschen. Anschließend wird die Membran erneut getrocknet und die phosphorylierten Proteine werden mit Hilfe des Typhoon-Trio Systems unter Benutzung des 580-nm Band-Pass Filters (580 BP 30) in Kombination mit der Image Quant TL Software 7.0 dargestellt.

5.4.8 Proteinfärbung mit Ponceau S

Proteine, die mittels Western Blot auf Nitrocellulose oder PVDF-Membranen übertragen wurden, können reversibel mit dem Azofarbstoff Ponceau S angefärbt werden ohne den nachfolgenden immunologischen Proteinnachweis zu stören. Dazu wird die PVDF-Membran 5 Minuten in der Ponceau S-Lösung (0.2% (w/v) Ponceau S, 15% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) geschwenkt und anschließend mit Waschpuffer II so weit entfernt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Nach der Dokumentation wird die PVDF-Membran dreimal 15 Minuten mit Waschpuffer II gewaschen, bevor sie geblockt werden kann.

5.4.9 Immunologischer Proteinnachweis

Zum immunologischen Nachweis eines Proteins auf der PVDF-Membran müssen zunächst unspezifische Bindestellen mit Hilfe des Blockpuffers (5% (w/v) Trockenmilchpulver in 1xPBST (pH 7.4) oder 1xTBST (pH 7.5)) für 1 h auf dem Schüttler geblockt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in Waschpuffer I (1% oder 5% (w/v) Trockenmilchpulver oder 5% (w/v) BSA in 1xPBST (pH 7.4) oder 1xTBST (pH 7.5)) verdünnt wird. Die Inkubationszeit beträgt entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Es folgen zwei fünfminütige Waschschrte mit Waschpuffer I, an die sich die Inkubation mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in Waschpuffer I) für

1 h bei RT anschließt. Die Membran wird nun zweimal je 10 Minuten mit Waschpuffer II gewaschen. Bei dem Enzym des Sekundärantikörpers handelt es sich um die Meerrettich-Peroxidase, die bei Inkubation mit Luminol und H_2O_2 ein Chemilumineszenz-Signal abgibt, das detektiert werden kann. Dazu wird die Membran für 2 Minuten mit äquivalenten Mengen an H_2O_2 -Lösung (10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.5, 55 μl 35% (w/v) H_2O_2) und Luminol-Lösung (10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.5, 1 ml 250 mM Luminol, 440 μl 90 mM p-Cumarsäure, ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$) inkubiert und das Signal anschließend mit Hilfe des Universal Hood II-Systems detektiert. Bei schwachen Signalen wird das SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Membran kann nach kurzer Inkubation in Methanol im getrockneten Zustand bei 4°C aufbewahrt und bei Bedarf wieder aktiviert werden.

5.4.10 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Isoliert man ein Protein aus einem Proteingemisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers bezeichnet man dies als Immunpräzipitation (IP). Weist man neben dem isolierten Protein auch daran gebundene Proteine, also Interaktionspartner nach, nennt man den Vorgang Co-Immunpräzipitation (Co-IP). Die Antikörper und die daran gebundenen Proteine werden über eine Protein A- oder Protein G-gekoppelte Sepharosematrix aufgereinigt. Möglich ist dies, da Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus* eine hohe Affinität zur Fc-Domäne des Antikörpers besitzen.

Aus den mit FLAG-C/EBP δ transfizierten HCT116 Zellen werden, wie in 5.4.2 beschrieben, Cytoplasma- und Zellkernextrakte hergestellt. Pro IP/Co-IP werden 500 μg Zellkernproteine eingesetzt, die im Verhältnis 1:1 mit EBC-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 100 mM NaF, 200 μM Natriumorthovanadat, 0.5% (v/v) NP-40) verdünnt werden. Die Sepharosematrix setzt sich pro Ansatz aus 20 μl Sepharose A und 30 μl Sepharose CL-4B zusammen, die zu Beginn dreimal mit einer 1:1-Mischung aus Kernlysepuffer C und EBC-Puffer vorequilibriert werden muss. Der Zellkernextrakt wird zunächst mit der Sepharosematrix vorinkubiert, was man als Vorpräzipitat (VP) bezeichnet. Dadurch werden bereits unspezifisch an die Sepharosematrix bindende Proteine entfernt. Parallel wird die Sepharosematrix des IP-Ansatzes mit 2 μg des C/EBP δ -spezifischen Antikörpers sc-636 beladen. Ein dritter Kontrollansatz enthält ausschließlich die Sepharosematrix. Nach 2 h Inkubation bei 4°C werden die ungebundenen Antikörper des IP-Ansatzes durch zweimaliges Waschen entfernt und der Überstand des VP-Ansatzes auf ihn übertragen. Die Bindung des

C/EBP δ an seinen Antikörper erfolgt bei 4°C für 3 h oder über Nacht. Die Sepharosematrix aller Ansätze wird nach Beendigung der jeweiligen Inkubation dreimal mit je 1 ml NETN-Puffer (20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) NP-40) gewaschen, bevor die gebundenen Proteine mit 40 μ l 2x SDS-Probenpuffer eluiert werden. Nach Erhitzen der Proben bei 95°C für 5 Minuten werden 35 μ l des Überstandes auf einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe des FLAG- und der CK2-spezifischen Antikörper.

5.4.11 Streptavidin-basierte Affinitätsreinigung von DNA-bindenden Proteinen ("pull-down")

Mit Hilfe des μ MACS™ Streptavidin Kits kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Bereiche der DNA *in vitro* untersucht werden. Über Streptavidin-gekoppelte magnetische MicroBeads kann eine biotinylierte DNA-Sonde mit ihren gebundenen Proteinen im magnetischen Feld über eine μ Säule aufgereinigt und die gebundenen Proteine im Anschluss eluiert und analysiert werden. In dieser Arbeit wird die Bindung von C/EBP β und C/EBP δ an den die beiden CCAAT-Boxen umspannenden Bereich des PPAR γ 2-Promotors (-287 bis -69) untersucht.

Dazu werden 3T3-L1 Zellen auf acht 145 mm Zellkulturschalen ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung eingeleitet. Die Zellen in zwei der 145 mm Zellkulturschalen erhalten Differenzierungsmix I plus DMSO und je drei erhalten Differenzierungsmix I plus 15 μ M CX-4945 bzw. 30 μ M Quinalizarin. Nach 24 h bzw. 48 h werden die Zellen der gleichen Behandlung gepoolt und wie in 5.4.2 beschrieben Cytoplasma- und Zellkernextrakte davon hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird je 1 mg der Zellkernextrakte abgefüllt und mit Kernlysepuffer C (450 mM NaCl) auf gleiche Volumina gebracht. Nun werden die Proben mit Kernlysepuffer C (ohne NaCl) im Verhältnis 1:3 verdünnt, sodass die Endkonzentration des NaCl 150 mM beträgt. Die verdünnten Extrakte werden mit Lachssperma-DNA (100 μ g/ml) versetzt und auf dem Überkopfschüttler (25 rpm) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wird zu jedem Ansatz 1 μ g biotinylierte PPAR γ 2-Sonde gegeben und weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nun erfolgt die Zugabe der Streptavidin-konjugierten MicroBeads (50 μ l/Ansatz). Nach 12-minütiger Inkubation auf dem Überkopfschüttler bei RT werden die Ansätze auf die zuvor zweimal mit 50 μ l Equilibrierungspuffer (für Proteine) und zweimal mit 100 μ l Kernlysepuffer C (150 mM NaCl) vorequilibrierten μ Säulen geladen. Diese müssen dazu im

magnetischen Feld des μ MACS Separators platziert werden. Die Säulen werden 15-mal mit je 100 μ l Kernlysepuffer C (150 mM NaCl) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgt mit auf 95°C vorgeheiztem 1xSDS-Probenpuffer. Zunächst werden die Säulen mit 20 μ l des SDS-Probenpuffers für 5 Minuten inkubiert und anschließend werden weitere 50 μ l SDS-Probenpuffer zugegeben und der Durchfluss aufgefangen. Das Eluat enthält die an die biotinylierte DNA-Sonde gebundenen Proteine.

5.4.12 *In vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay

Die Kinaseaktivität der Proteinkinase CK2 im Zellextrakt kann *in vitro* durch den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD bestimmt werden. Dazu werden pro Ansatz 15-30 μ g des Zellextrakts auf 20 μ l mit CK2 Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) aufgefüllt. Um einen Effekt des Lysepuffers auszuschließen werden alle Proben auf das eingesetzte Volumen der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration angepasst. Anschließend werden 30 μ l radioaktiver CK2 Reaktionsmix (41.6 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 8.4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 84 μ M ATP, 0.32 mM synthetisches Peptid, 1 μ l [³²P]- γ -ATP/0.5 ml) hinzugefügt, gemischt und die Ansätze 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zurückstellen auf Eis wird die Reaktion abgestoppt und 45 μ l des Ansatzes werden auf ein Ionenaustausch-Filterpapier (Whatman P81) pipettiert. Die Ionenaustausch-Papiere werden dreimal je 5 Minuten mit 85 mM Phosphorsäure gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Es folgt ein letzter Waschschrift mit Ethanol für 5 Minuten, bevor die Papiere unter Rotlicht getrocknet und in Szintillationsröhrchen überführt werden. Im Szintillationszähler kann nun die von der Probe abgegebene Čerenkov-Strahlung gemessen werden. Für jede Probe wird eine Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Positivkontrolle dient ein Ansatz mit 1 μ l CK2 Holoenzym in CK2 Kinasepuffer. Um die Hintergrundstrahlung zu erfassen werden 2 bis 3 Ansätze ohne Protein mitgeführt.

5.4.13 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lässt sich die Expression und Lokalisation eines Proteins auf Zellebene untersuchen. Dazu werden die Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Für die Immunfluoreszenz-Analyse werden die Zellen auf Glas-Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) oder in Nunc[®] Lab-Tek[®] 8-Loch Permanox[®]-Slides ausgesät. Zur besseren Haftung

der Zellen können die Deckgläschen mit L-Lysin beschichtet werden. Dazu pipettiert man unter sterilen Bedingungen 100 µl verdünnte L-Lysin-Lösung auf die Deckgläschen und lässt sie für 5 Minuten bei RT inkubieren. Das L-Lysin wird abgesaugt und die Deckgläschen werden für 1 h bei 60°C im Trockenschrank oder über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend werden die Zellen auf die so behandelten Deckgläschen ausgesät. Nach dem Ende der gewünschten Behandlung werden die Zellen vorsichtig mehrmals mit 1xPBS (pH 7.4) gewaschen und anschließend für 10 Minuten in Fixierlösung (2% Formaldehyd in 1xPBS (pH 7.4)) inkubiert. Es folgen drei kurze Waschschrte mit 1xPBS. Möchte man die Immunfluoreszenz erst zu einem späteren Zeitpunkt fortsetzen, können die fixierten Zellen in 1xPBS (pH 7.4) mit 0.02% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert werden. Nach der Fixierung erfolgt die Permeabilisierung der Zellen, indem man sie 5 Minuten in der Permeabilisierungslösung (2% (w/v) BSA, 0.2% (v/v) Triton X-100 in 1xPBS (pH 7.4)) inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch dreimaliges Waschen für je 10 Minuten in Waschlösung (1% (w/v) BSA in 1xPBS (pH 7.4)) geblockt. Vom in Waschlösung verdünnten Primärantikörper werden 50 µl pro Deckgläschen verwendet. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS (pH 7.4) für je 10 Minuten entfernt. Die Inkubation mit dem in Waschlösung verdünnten Sekundärantikörper (50 µl) erfolgt für 1 h bei RT in der feuchten Kammer. Da der Fluoreszenzfarbstoff des Sekundärantikörpers bei Lichtkontakt ausbleicht, müssen alle restlichen Schritte möglichst im Dunkeln durchgeführt werden. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS (pH 7.4) für je 10 Minuten entfernt. Zur besseren Unterscheidung von Zellkern und Cytoplasma wird die DNA des Zellkerns mit DAPI angefärbt. Dies geschieht (a) durch Färbung der Zellen mit verdünnter DAPI-Stocklösung (20 µl 5 µg/ml DAPI ad 1 ml PBS oder Methanol) für 15 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer, drei darauf folgenden 5-minütigen Waschschrten mit 1xPBS (pH 7.4) und dem Eindecken in Mounting Medium (10% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) Polyvinylalkohol 25/140 in 1xPBS (pH 7.4)) oder (b) durch Eindecken in DAPI-haltigem ProLong[®] Diamond Antifade Mountant von Thermo Fisher Scientific. Bei beiden Varianten werden die Zellen vor dem Eindecken auf die Objektträger im Dunkeln getrocknet. Bei den Nunc[®] Lab-Tek[®] 8-Loch Permanox[®]-Slides befinden sich die Zellen bereits auf dem Objektträger und werden nach Entfernung der Kammern mit einem rechteckigen Deckgläschen (24 x 50 mm) eingedeckt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Zeiss Axiovert 100 Mikroskop mit den zum jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff passenden Filtersets.

Die Immunfluoreszenz-Färbung der SVZ-Zellen wurde in Zweibrücken von Frau Monika Martin durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von mir angefertigt. Die praktische Durchführung verläuft sehr ähnlich, weshalb hier nur die Änderungen zum oben beschriebenen Protokoll angegeben sind. Die Fixierung findet mit 4% Formaldehyd für 20 Minuten und die Permeabilisierung mit 0.5% Triton X-100 für 10 Minuten statt. Geblockt wird mit 10% normalem Eselserum für 30 Minuten. Die Antikörper werden in 1xPBS (pH 7.4) ohne zusätzliches BSA gelöst. Die Inkubationszeit der Primärantikörper beträgt 1 h bei RT. DAPI (Sigma-Aldrich) wird im Verhältnis 1:500 für 5 Minuten eingesetzt und eingedeckt wird mit Fluorescence Mounting Medium (Dako).

5.4.14 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay ("TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling") wird zum Nachweis des programmierten Zelltods (Apoptose) verwendet. Dabei werden die während der Apoptose entstehenden Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA durch eine enzymatische Reaktion kenntlich gemacht. Bei dem Enzym handelt es sich um die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT), die markierte Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden der DNA-Strangbrüche anheftet. In SVZ-Zellen wird die Induktion der Apoptose mithilfe des *In Situ* Cell Death Detection Kits, Fluorescein der Firma Roche detektiert. Der Nachweis erfolgt durch den Einbau von Fluorescein-gekoppelten dUTPs, die man mikroskopisch detektieren kann (Excitation: 450-500 nm, Emission: 515-565 nm, grün).

Die SVZ-Neurosphären werden auf ECM-beschichtete Deckgläschen ausgesät und mit 20 µM Retinsäure differenziert. An Tag 5 der Differenzierung werden die Zellen mit 4% (v/v) Formaldehyd in 1xPBS (pH 7.4) für 20 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS (pH 7.4) werden die Zellen mit Permeabilisierungslösung (0.1% (v/v) Triton X-100 in 0.1% (w/v) Natriumcitrat) für 2 Minuten auf Eis permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen erneut zweimal mit 1x PBS (pH 7.4) gewaschen und in einer feuchten Kammer 1 h bei 37°C mit je 50 µl TUNEL-Reaktionsmix pro Deckgläschen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS (pH 7.4) werden die Zellen mit DAPI-haltigem ProLong[®] Diamond Antifade Mountant eingedeckt und mikroskopiert. Als Positivkontrolle dienen Zellen, deren DNA mit 3 U DNase I für 10 Minuten bei 37°C hydrolysiert wurde.

5.4.15 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein Test zur Überprüfung der Zellvitalität, bzw. genauer der metabolischen Aktivität der Zellen. Dabei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen durch Reduktion des Substrats 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in wasserunlösliches blaues Formazan, das sich als Kristalle ablagert, nachgewiesen. Die Kristalle werden gelöst und können dann photometrisch vermessen werden.

Je 1×10^4 hMSC werden pro Kavität in eine 24-Loch-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit DMSO, 20-40 μ M Quinalizarin oder 20-40 μ M CX-4945 behandelt. Nach je 24, 48 und 72 h erfolgt der MTT-Assay. Dazu werden 50 μ l MTT-Substratlösung (1 mg MTT gelöst in 1 ml 1xPBS, pH 7.4) in das Medium der Zellen pipettiert und gemischt. Es folgt eine Inkubation für 1-4 h im Brutschrank bei 37°C, bis blaue Kristalle beobachtet werden können. Die Inkubationszeiten der 48 und 72 h-Proben richten sich nach der Inkubationszeit der 24 h-Proben. Das Kulturmedium wird abgesaugt und in jede Kavität werden 500 μ l Solubilisierungslösung (10% (w/v) SDS, 0.6% (v/v) Essigsäure, ad 100% DMSO) gegeben, die die Kristalle lösen und sich dabei blau-lila verfärben. Je 200 μ l der Lösung werden als Doppelbestimmung in eine 96-Loch-Platte überführt und im Infinite M200 Pro TECAN Reader bei 595 nm vermessen. Als Referenz dient eine Messung bei 695 nm.

5.4.16 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay dient zum Nachweis der Aktivität eines Promotors. Dazu wird der zu untersuchende Bereich oder der komplette Promotor vor ein Reportergen, dessen Expression leicht zu verfolgen ist, wie GFP, Luciferase oder β -Galaktosidase, kloniert. Durch Messung des Reportergen-Signals kann die Aktivität des Promotors bei unterschiedlichen Bedingungen verglichen werden. In dieser Arbeit wird als Reportergen die *Firefly*-Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* verwendet. Das Enzym gehört zu Klasse der Oxidoreduktasen und ist 61 kDa groß. In Anwesenheit von Mg^{2+} wird unter ATP- und O_2 -Verbrauch Luciferin zu Oxyluciferin monooxygeniert. Beim Übergang des Oxyluciferins vom angeregten zum Grundzustand kommt es zur Biolumineszenz, die detektiert werden kann.

Die HCT116 Zellen werden wie in 5.3.10 beschrieben in 24-Loch-Platten ausgesät und transfiziert. Der Transfektionsansatz setzt sich wie folgt zusammen: 0.05 μ g pGL4.10-LV oder pGL4.10-PPAR γ 2 und 0.45 μ g Expressionsplasmid, wobei bei mehreren Expressionsplasmiden die eingesetzte Menge gleichmäßig aufgeteilt wird. Für jede

Plasmidkombination werden 2-3 Kavitäten parallel transfiziert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS (pH 7.4) durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer (Cell Culture Lysis Reagent) und Inkubation auf dem Schüttler für 15 Minuten bei RT. Die Extrakte werden in Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 16100xg zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Für den Luciferaseassay werden 20 µl des Überstandes in 96-Loch-Platten pipettiert. Der Infinite M200 Pro TECAN Reader gibt 50 µl Luciferase Assay Reagenz zu einer Probe und die entstehende Lumineszenz wird über 10 s gemessen. Auf diese Weise wird eine Probe nach der nächsten gemessen, ohne dass es zu einem Signalverlust kommt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wird bestimmt und die erhaltenen Werte werden auf die eingesetzte Proteinmenge normiert. Die Transfektionseffizienz wird durch immunologischen Nachweis von FLAG-C/EBPδ im Western Blot überprüft.

Die Aussaat und Transfektion der 3T3-L1 Zellen erfolgt wie in 5.3.10 beschrieben. Da hier nur Reporterkonstrukte transfiziert werden und dadurch kein Protein im Western Blot nachgewiesen werden kann, wird zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eine zweite Luciferase, die *Renilla*-Luciferase aus der Oktokorallenart *Renilla reniformis* mittransfiziert. Der Zellaufschluss erfolgt durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 1xPBS (pH 7.4) und Inkubation mit 100 µl Lysepuffer (Passive Lysis Reagent) für 15 Minuten bei RT. Zur Verbesserung des Aufschlusses werden die 24-Loch-Platten mindestens 4 Stunden bei -20°C gelagert, bevor 20 µl daraus entnommen und in eine 96-Loch-Platte überführt werden. Die Messung der Biolumineszenz erfolgt in zwei Schritten mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega. Zuerst wird die Aktivität der *Firefly*-Luciferase gemessen (10 s), indem 50 µl Luciferase Assay Reagenz II zugegeben werden. Diese Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 50 µl Stop & Glo® Reagenz unterdrückt, wobei parallel die Aktivität der *Renilla*-Luciferase über 10 s gemessen werden kann. Die Normierung der Transfektionseffizienz erfolgt durch Division der gemessenen Werte (*Firefly*/*Renilla*). Zum Ausschluss eines Einflusses der Inhibitoren auf das experimentelle System werden die pGL4.10-PPARγ2-Werte durch die pGL4.10-LV-Werte geteilt und der daraus gebildete Quotient zur Normierung der Aktivität verwendet.

6. Ergebnisse

Studien an "knock-out" Mäusen belegen, dass die Proteinkinase CK2 für eine normale embryonale Entwicklung und das Überleben des Embryos notwendig ist [97, 98]. Unabhängig davon ist wenig über einen Einfluss der CK2 auf Differenzierungsprozesse in einzelnen Geweben bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass sie für die myogene Differenzierung, die Osteoblastendifferenzierung und die Differenzierung von Zellen des haematopoetischen Systems wichtig sein könnte [106-112]. Für die Adipogenese konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung der CK2 mit DMAT oder Quinalizarin die Differenzierung in 3T3-L1 Zellen inhibiert [113]. DMAT geriet jedoch in den letzten Jahren als CK2-Inhibitor in Verruf, da gezeigt werden konnte, dass es die Bildung von Sauerstoffradikalen induziert [119]. Zusätzlich dazu besitzt es ein sehr unspezifisches Wirkprofil und hemmt neben der CK2 zahlreiche weitere Kinasen [120]. Quinalizarin hingegen wurde vor kurzem als verlässlicher CK2-Inhibitor bestätigt [121]. Zur Verifizierung der mit einem Inhibitor erhaltenen Ergebnisse und zum Ausschluss eventueller Nebeneffekte sollte nach Möglichkeit immer ein zweiter Inhibitor verwendet werden. In dieser Arbeit wurde neben Quinalizarin auch CX-4945 eingesetzt, das aktuell in klinischen Studien auf sein Potential als Tumorthapeutikum untersucht wird [122]. CX-4945 wurde an 238 Kinasen getestet und zeigte die beste Spezifität für die Proteinkinase CK2 mit einem Ki-Wert von 0.38 nM *in vitro* [123]. Quinalizarin besitzt einen Ki-Wert von 55 nM *in vitro* und wurde an 140 Kinasen getestet [124, 121]. Es gibt natürlich noch viele andere Inhibitoren, die aber in aller Regel eine schlechtere Spezifität oder Hemmeffizienz aufweisen. Ein weiterer Inhibitor im klinischen Einsatz ist CIGB-300 [125]. Im Vergleich zu CX-4945 weist CIGB-300 einen anderen Hemmmechanismus auf [126, 127].

6.1 CK2 und neurale Differenzierung

Die Expression der CK2 ist während der embryonalen Entwicklung der Maus im Neuroepithel am stärksten [95]. Huillard *et al.* konnten zeigen, dass CK2 β eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Oligodendrozyten während der embryonalen Gehirnentwicklung spielt [103]. Zusätzlich dazu gibt es Hinweise darauf, dass die CK2 auch bei der Synaptogenese und der Dendritenreifung wichtig ist [105]. Aus diesen Gründen liegt es nahe, eine potentielle Rolle der CK2 bei der Gehirnentwicklung näher zu untersuchen. Dazu bietet sich das System des Neuroblasten-Assays an. Dabei werden neurale Stammzellen aus der

SVZ postnataler Mausgehirne isoliert und *in vitro* hinsichtlich ihrer Proliferations- und Differenzierungskapazität untersucht. Aufbauend auf bzw. ergänzend zu den von Frau Melanie Bender in ihrer Bachelorarbeit [128] erhaltenen Ergebnissen wird in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe "Enteric Nervous System" von Prof. Dr. Schäfer, Hochschule Kaiserslautern, Campus Zweibrücken die Differenzierung neuraler Stammzellen zu Neuronen und Gliazellen, sowie der Einfluss der CK2 auf diesen Prozess untersucht.

6.1.1 Vorstellung des Differenzierungssystems

Um zunächst einen Überblick über das Differenzierungssystem zu erhalten, werden undifferenzierte und differenzierte Neurosphären hinsichtlich ihrer Zelltypzusammensetzung miteinander verglichen. Dazu werden gängige Markerproteine der einzelnen Zelltypen in der Immunfluoreszenz und auf Western Blot-Ebene untersucht.

Für die Immunfluoreszenz werden SVZ-Zellen, die nach der Isolation für 3-5 Tage in Proliferationsmedium zu Neurosphären herangewachsen sind, auf mit extrazellulärer Matrix (ECM)-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Ein Teil wird direkt nach dem Absetzen der Neurosphären fixiert, was undifferenzierten Zellen entspricht. Der andere Teil wird nach dem Absetzen der Neurosphären in Differenzierungsmedium mit 20 μ M Retinsäure (RA) für fünf Tage differenziert bevor sie fixiert werden. Die Mikroskopie der beiden Zellpopulationen erfolgt auf unterschiedliche Weise. Da die Zellen als Neurosphären ausgesät werden, müssen die undifferenzierten Zellen in ebendieser Form mikroskopiert werden. Dazu werden Z-Stapel durch den kompletten Sphäroid generiert, die nachfolgend mit dem Programm ImageJ zu einem Bild zusammengefügt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Intensität der Fluoreszenzen während der Bearbeitung nicht verändert wird. Während der Differenzierung bilden die Neurosphären Ausläufer. Diese Ausläufer werden für die Aufnahmen der differenzierten Proben verwendet, da sie übersichtlicher sind und ohne Z-Stapel aufgenommen werden können. Für die Western Blot-Analyse werden die proliferierenden Neurosphären mit Accutase vereinzelt, ein Teil wird geerntet und bei -80°C gelagert (undifferenziert). Der andere Teil wird in RA-haltigem Differenzierungsmedium ausgesät und für fünf Tage differenziert, bevor die Zellen geerntet werden. Nach dem Aufschluss werden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und die Expression der Markerproteine im Western Blot untersucht.

Bei den Markerproteinen handelt es sich um Komponenten des Zytoskeletts, die für einen bestimmten Zelltyp spezifisch sind [22]. Astrozyten, die zu den Gliazellen gehören und den

Großteil der differenzierten Neurosphären ausmachen, lassen sich mit Hilfe des "glial fibrillary acidic protein" (GFAP) darstellen. Neurone exprimieren die Tubulin-Isoform β III. Die neuralen Stammzellen können mit dem neuroepithelialen Stammzellprotein (Nestin) nachgewiesen werden. Während der Mitose wird Nestin durch cdc2 an Threonin 316 phosphoryliert, um den Umbau des Zytoskeletts zu ermöglichen [129]. Durch einen phosphospezifischen Nestin-Antikörper lassen sich also die gerade in Teilung befindlichen Zellen innerhalb der Neurosphären anfärben. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

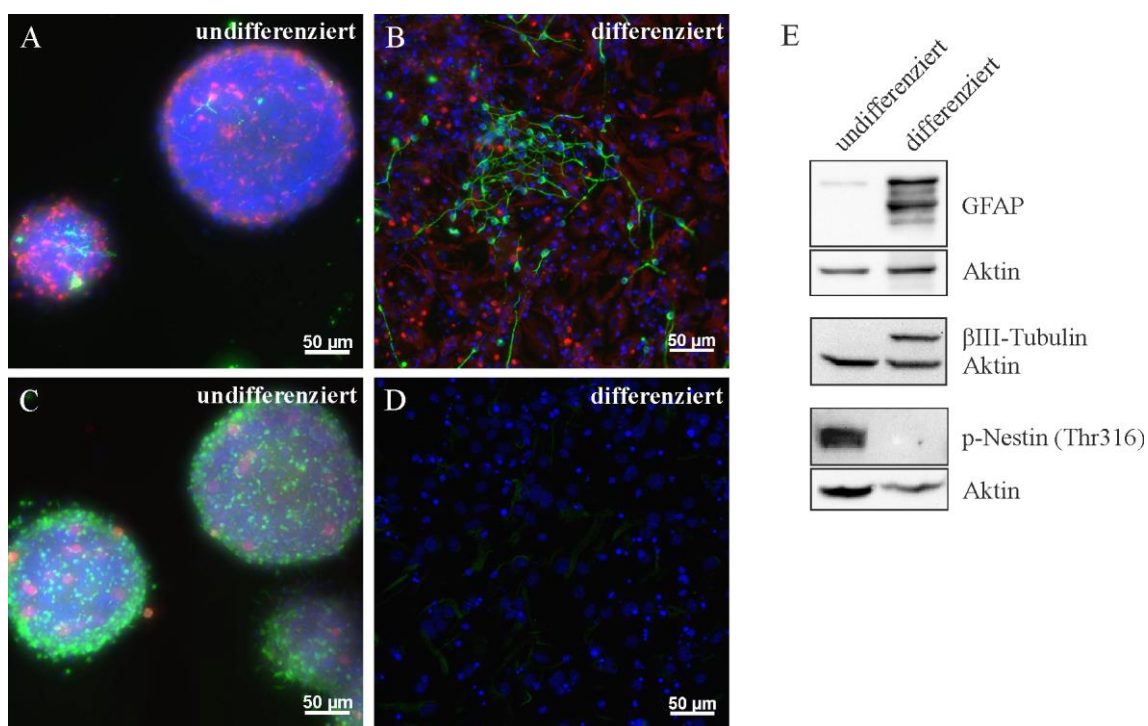


Abbildung 5: Expressionsprofile der Markerproteine GFAP, β III-Tubulin, Nestin und p-Nestin (Thr316) in undifferenzierten und differenzierten SVZ-Zellen. (A-D) Proliferierende Neurosphären werden auf ECM-beschichteten Deckgläschen ausgesät und entweder direkt nach dem Absetzen fixiert (undifferenziert, A, C) oder durch den Wechsel zu Differenzierungsmedium mit 20 μ M Retinsäure über fünf Tage differenziert und dann erst fixiert (differenziert, B, D). Repräsentative Aufnahmen der Markerproteine GFAP (rot) und β III-Tubulin (grün) sind in A und B und Gesamt-Nestin (grün) und phospho-Thr316-Nestin (rot) in C und D dargestellt. Sie werden mit den spezifischen Antikörpern Z0334 (GFAP), MAB1637 (β III-Tubulin), MAB535 (Nestin) und sc-33879 (p-Thr316-Nestin) detektiert und mithilfe der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Esel-Anti-Maus-IgG und Alexa Fluor 596 Esel-Anti-Kaninchen-IgG sichtbar gemacht. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt. Die Gesamtvergrößerung beträgt 200-fach, der Maßstabsbalken 50 μ m. (E) Am Tag der Aussaat für das Differenzierungsexperiment wird ein Teil der SVZ-Zellen geerntet (undifferenziert) und der andere Teil ausgesät und für fünf Tage in Differenzierungsmedium mit 20 μ M Retinsäure differenziert und dann geerntet. Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten werden 10 μ g (GFAP) und 50 μ g (β III-Tubulin, p-Nestin) Gesamtprotein jeder Probe auf einem 7.5 bzw. 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und per Western Blot auf eine

PVDF-Membran transferiert. Die Markerproteine werden mit den in A-D beschriebenen Antikörpern nachgewiesen. Aktin (sc-1615) dient als Ladekontrolle.

In Abb. 5 A und B erkennt man, dass bereits undifferenzierte Neurosphären geringe Mengen an Neuronen (grün) enthalten, ihre Zahl jedoch in der differenzierten Kultur deutlich ansteigt. Die Expression von GFAP (rot) ist in den undifferenzierten Neurosphären bereits hoch, was mit dem astrozytären Charakter der neuralen Stammzellen übereinstimmt [130]. Sie nimmt in den differenzierten Zellen nicht unbedingt zu, jedoch steigt die Anzahl der GFAP-positiven Zellen deutlich an. Bei nahezu jeder Zelle, die kein Neuron ist, handelt es sich um einen Astrozyt. Das Markerprotein Nestin (grün) ist in undifferenzierten Neurosphären in großen Mengen vorhanden und nimmt bei Differenzierung der Zellen ab (Abb. 5 C, D). Phosphoryliertes Nestin (rot) ist ebenfalls nur in undifferenzierten Neurosphären vorhanden. Die Western Blot Analyse (Abb. 5 E) bestätigt die mittels Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse. Für GFAP sind in der differenzierten Kultur mehrere Banden zu beobachten. Dies kommt dadurch zustande, dass GFAP aufgrund von alternativem Spleißen in mehreren Isoformen existiert, die alle durch den Antikörper detektiert werden [131].

Somit kann festgestellt werden, dass das Differenzierungssystem des Neurosphären-Assays funktionsfähig und für die nachfolgenden Untersuchungen geeignet ist. Bei der Differenzierung der Zellen wird der Stammzellmarker Nestin in Astrozyten durch GFAP und in Neuronen durch β III-Tubulin abgelöst.

6.1.2 Untersuchungen zur CK2-Hemmung mit CX-4945 und Quinalizarin

Die Hemmung der CK2 erfolgt mit den Hemmstoffen CX-4945 und Quinalizarin (Q). Frau Bender untersuchte in ihrer Bachelorarbeit den Einfluss verschiedener Konzentrationen an CX-4945 auf die Proliferation der SVZ-Sphäroide. Sie konnte dabei eine signifikante Reduktion der Proliferation ab einer Konzentration von 10 μ M CX-4945 beobachten, die mit steigender CX-4945-Konzentration zunahm. Zudem bildeten sich bei hohen Konzentrationen (20 bzw. 25 μ M) deutlich weniger Sphäroide aus [128].

6.1.2.1 Bestimmung der CK2-Aktivität nach Hemmung

Durch die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität wird kontrolliert, ob die verwendeten Hemmstoffkonzentrationen eine effektive Hemmung der CK2 bewirken und der Einfluss auf die Proliferation somit tatsächlich durch die Hemmung der CK2 ausgelöst wird. Zusätzlich

wird die Konzentration an Q bestimmt, die für die nachfolgenden Versuche eingesetzt werden kann, da keine Vorversuche bezüglich der Proliferation mit diesem Hemmstoff durchgeführt wurden. Ziel ist es, die Konzentration zu finden, die eine gute Hemmeffizienz bei möglichst niedriger DMSO-Konzentration erreicht.

Proliferierende SVZ-Neurosphären werden dissoziiert und in gleichen Mengen ausgesät. Nach einer Regenerationsphase von 48 h, in der sich erneut kleine Neurosphären ausbilden, werden diese für 24 h mit dem Lösemittel DMSO oder verschiedenen Konzentrationen an CX-4945 und Q behandelt. Parallel wird die CK2-Aktivität in unbehandelten Zellen untersucht, um einen Einfluss des DMSO auszuschließen. Aus gleichen Mengen Gesamtzellextrakt wird durch Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das CK2-Substratpeptid die Aktivität der endogenen CK2 bestimmt. Das verwendete Substratpeptid mit der Aminosäuresequenz RRRDDDSDDD besitzt mit dem Serin in der sauren Umgebung der Aspartatreste perfekte Voraussetzungen für eine Phosphorylierung durch die CK2. Zudem ermöglichen die drei Argininreste die einfache Isolation des Substratpeptids aus dem Gemisch über ein Ionenaustauschpapier [132]. Abb. 6 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

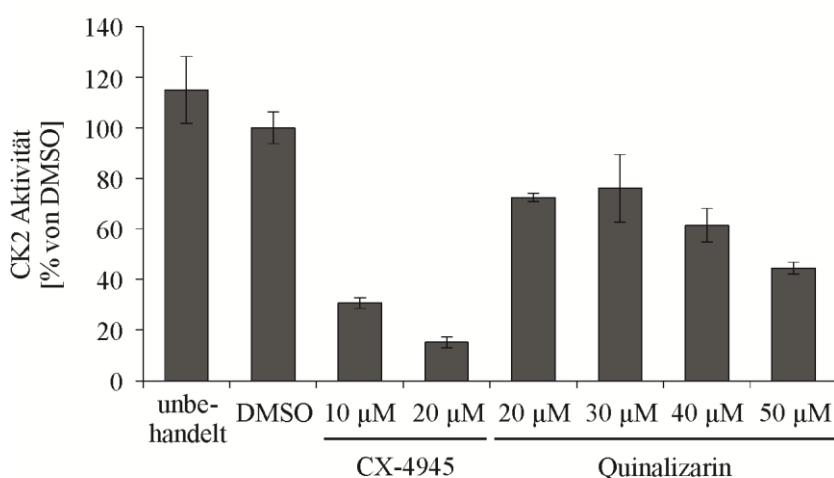


Abbildung 6: CK2-Aktivität in undifferenzierten SVZ-Zellen in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration. Eine Million SVZ-Einzelzellen werden in T25 Zellkulturflaschen ausgesät, 48 h in Proliferationsmedium inkubiert und anschließend für 24 h mit DMSO, 10 bzw. 20 µM CX-4945 oder 20-50 µM Quinalizarin behandelt. Die Zellen einer unbehandelten Zellkulturflasche dienen als Kontrolle. Es werden Gesamtzellextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Protein in einem *in vitro*-CK2-Kinaseaktivitäts-Assay hinsichtlich der CK2-Aktivität untersucht. Die erhaltenen cpm-Werte sind auf DMSO normiert (100%).

Sowohl 10 µM als auch 20 µM CX-4945 sind sehr effektiv in ihrer Hemmung der CK2-Aktivität. Die Restaktivität beträgt bei 10 µM CX-4945 31% und bei 20 µM lediglich 18%

verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Bei der Hemmung mit Q ist die Restaktivität höher. Sie liegt bei 72% (20 μM), 76% (30 μM), 61% (40 μM) und 45% (50 μM). Die CK2-Aktivität der DMSO-Kontrolle ist im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht reduziert.

Frau Bender führte die Differenzierungsversuche mit 20 μM CX-4945 durch, beobachtete jedoch eine hohe Zelltoxizität [128]. Aus diesem Grund wird CX-4945 in dieser Arbeit in einer Konzentration von 10 μM verwendet. Q muss in vergleichsweise hohen Konzentrationen eingesetzt werden, um eine effektive Hemmung zu erreichen. Da es in DMSO gelöst ist und dies in hohen Konzentrationen toxisch für die Zellen ist, muss ein Kompromiss zwischen Hemmeffizienz und eingesetzter DMSO-Konzentration geschlossen werden. Deshalb wird für die Differenzierungsversuche eine Konzentration von 40 μM eingesetzt.

6.1.2.2 Bestimmung der CK2-Expression nach Hemmung

Die Reduktion der CK2-Aktivität könnte auf eine verminderte Proteinexpression der CK2-Untereinheiten zurückzuführen sein, was wiederum unabhängig von der Hemmung der Kinaseaktivität Einfluss auf das Verhalten der Zellen während der Differenzierung nehmen könnte. So könnte die CK2 unabhängig von ihrer Eigenschaft als Kinase auch als Bindungspartner benötigt werden. Dies konnte bereits für mehrere Proteine, darunter USF2 und TNF1, gezeigt werden [133, 64]. Deshalb wird im Anschluss die CK2-Expression nach Hemmung untersucht. Dazu werden gleiche Mengen der obigen Proteinextrakte in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die einzelnen CK2-Untereinheiten nach dem Transfer mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

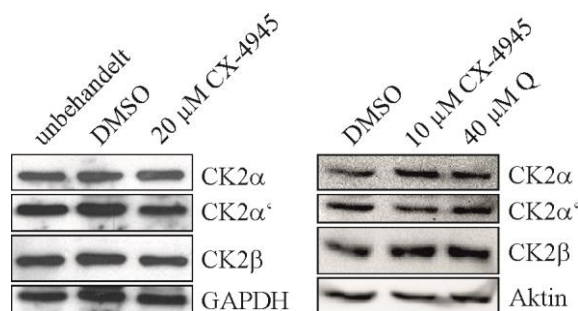


Abbildung 7: Expression der CK2-Untereinheiten in undifferenzierten SVZ-Zellen. Eine Million SVZ-Einzelnzellen werden in T25 Zellkulturflaschen ausgesät, 48 h in Proliferationsmedium inkubiert und anschließend für 24 h mit DMSO, 10 bzw. 20 μM CX-4945 oder 40 μM Quinalizarin behandelt. Die Zellen einer unbehandelten Zellkulturflasche dienen als Kontrolle. Nach der Herstellung von Gesamtzellextrakten werden 30 μg Protein in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

CK2 α wird mit dem monoklonalen Mausantikörper 1A5, CK2 α' mit dem polyklonalen Kaninchenserum #30 und CK2 β mit dem monoklonalen Mausantikörper sc-46666 detektiert. GAPDH und Aktin dienen als Ladekontrollen und werden mit den Antikörpern sc-25778 und sc-1615 nachgewiesen.

Anhand der erhaltenen Proteinbanden lässt sich nachweisen, dass die Expression der CK2-Untereinheiten durch die Hemmung mit CX-4945 oder Q weder erhöht noch erniedrigt wird. Auch das Lösemittel DMSO hat keinen Einfluss auf die Expression.

Es ist also möglich, die Kinaseaktivität der CK2 mit CX-4945 oder Q zu hemmen ohne ihre Menge oder ihr stöchiometrisches Verhältnis zu verändern.

6.1.3 Einfluss der CK2 auf die neuronale und gliale Differenzierung

Da nachgewiesen ist, dass das Differenzierungssystem funktioniert und die CK2 in diesen Zellen mit CX-4945 und Q gehemmt werden kann, wird nun der Einfluss der CK2 auf die postnatale Differenzierung von neuronalen Stammzellen aus der SVZ zu Neuronen und Astrozyten untersucht.

6.1.3.1 Mikroskopische Analyse mittels Immunfluoreszenz

Eine Möglichkeit die Differenzierung zu untersuchen, ist die Färbung der Zelltypen in der Neurosphären-Kultur mittels Immunfluoreszenz. Dazu werden 5 Tage alte Neurosphären auf ECM-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Differenzierung wird durch Zugabe von 20 μ M Retinsäure zum Medium induziert und die Neurosphären werden für 5 Tage differenziert. Zur Überprüfung eines potentiellen zeitlichen Einflusses der CK2-Hemmung wird der Inhibitor entweder direkt mit dem Differenzierungsmix zugegeben oder erst 72 h nach induzierter Differenzierung. Alle Ansätze werden an Tag 5 der Differenzierung fixiert und der Differenzierungsstatus wird mittels GFAP/ β III-Tubulin-Doppelfärbung überprüft (Abb. 8).

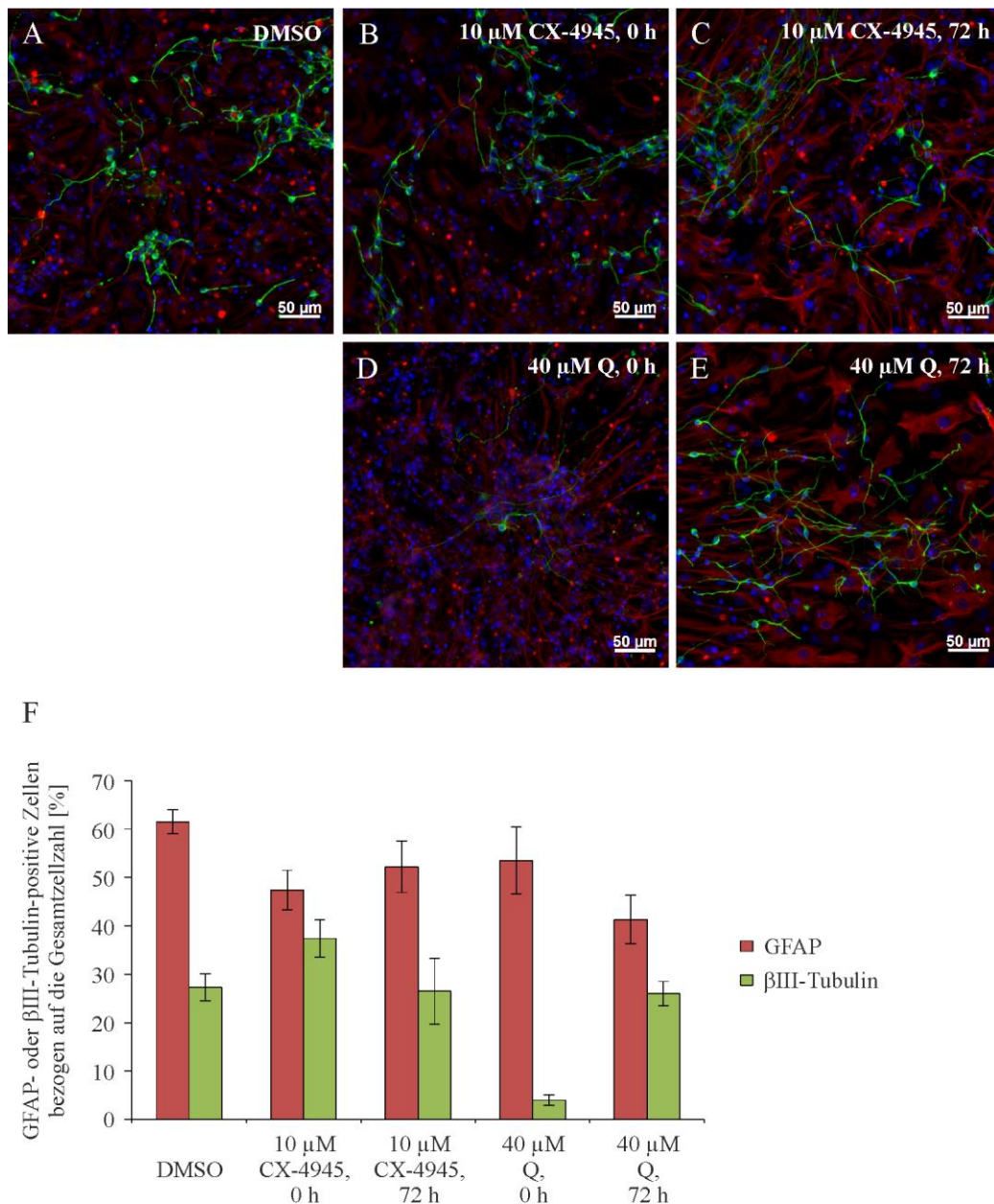


Abbildung 8: Einfluss der CK2-Inhibitoren CX-4945 und Quinalizarin (Q) auf die neuronale und gliale Differenzierung. SVZ-Neurosphären werden auf ECM-beschichteten Deckgläsern ausgesät und die Differenzierung wird durch Zugabe von 20 μM Retinsäure induziert. Die Inhibitoren (10 μM CX-4945 und 40 μM Q) werden entweder direkt zum Differenzierungsmix hinzugegeben (0 h, B, D) oder erst 72 h nach Differenzierungsbeginn appliziert (C, E). DMSO dient als Kontrolle (A). Die Zellen werden an Tag 5 der Differenzierung fixiert und der Differenzierungsstatus durch Färbung von GFAP und βIII-Tubulin überprüft. (A-E) GFAP (rot) und βIII-Tubulin (grün) werden mit den Antikörpern Z0334 und MAB1637 detektiert und mithilfe der Sekundärantikörper Alexa Fluor 596 Esel-Anti-Kaninchen-IgG und Alexa Fluor 488 Esel-Anti-Maus-IgG sichtbar gemacht. Die Kerne sind mit DAPI angefärbt. Gesamtvergrößerung: 200x, Maßstab Balken 50 μm. (F) Prozentuale Verteilung der GFAP- oder βIII-Tubulin-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI). Zur Berechnung der Verteilung wurden je 20 zufällige Bildausschnitte einer 320x-Vergrößerung ausgezählt.

Die Differenzierung der mit DMSO behandelten Neurosphären (Abb. 8 A) verläuft ähnlich wie die der unbehandelten Zellen (Abb. 5 B), woraus man schließen kann, dass die eingesetzte Konzentration an DMSO nicht schädlich für die Zellen ist. Die Auszählung der GFAP- und β III-Tubulin-positiven Zellen (Abb. 8 F) zeigt, dass die beiden Zelltypen etwa 89% der gesamten Zellpopulation ausmachen, wobei es etwa doppelt so viele Astrozyten wie Neurone gibt. Die beiden mit 10 μ M CX-4945 behandelten Kulturen (Abb. 8 B, C) zeigen ein ähnliches Bild wie die DMSO-Kontrolle. Neurone (grün) und Astrozyten (rot) weisen eine normale Morphologie auf. Bei der Betrachtung der zahlenmäßigen Verteilung wird deutlich, dass, unabhängig von der zeitlichen Zugabe des Inhibitors, weniger Zellen zu Astrozyten differenziert sind. Bei Zugabe des Inhibitors nach 72 h steigt die Zahl der Astrozyten im Vergleich zur direkten Zugabe um etwa 5% an, liegt jedoch immer noch fast 10% unter der von DMSO. Die Zahl der Neurone ist bei Hemmung der CK2 von Beginn der Differenzierung an erhöht, dieser Einfluss schwindet jedoch wenn die Hemmung erst nach 72 h erfolgt. Eine deutlich größere Abweichung zur DMSO-Kontrolle zeigt die Differenzierung mit 40 μ M Q bei direkter Zugabe des Inhibitors (Abb. 8 D). Es sind deutlich weniger Neurone vorhanden und diese weisen eine zum Teil veränderte Morphologie auf. Bei dieser Behandlung wurden stets weniger Ausläufer der Neurosphären beobachtet, was durch verringerte Motilität oder ein verstärktes Absterben hervorgerufen werden könnte. Auch die Betrachtung des DAPI-Signals lässt Zellen erkennen, die sich im Prozess der Apoptose befinden könnten. Eine Zugabe von Q nach 72 h (Abb. 8 E) bewirkt lediglich eine Reduktion der Astrozytenzahl. Morphologie und Anzahl der Neurone sind vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle.

6.1.3.2 Analyse auf Proteinebene

Zur Überprüfung der mit der Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse und des Hemmerfolgs werden SVZ-Einzelnzellen in Zellkulturflaschen ausgesät und für 5 Tage in Differenzierungsmix inkubiert. Auch hier werden die Inhibitoren dem Medium entweder direkt (0 h) oder erst nach 72 h zugefügt. Die Zellen werden an Tag 5 der Differenzierung geerntet und nach Herstellung von Gesamtzellextrakten wird daraus die CK2-Aktivität mittels *in vitro*-CK2-Kinaseaktivitäts-Assay bestimmt. Parallel wird die Expression der Markerproteine GFAP und β III-Tubulin immunologisch im Western Blot untersucht. Diese Analyse konnte mit 40 μ M Q nicht durchgeführt werden, da die Zellen mit Q im Medium nicht an den Boden der Zellkulturflasche adhärten und somit nicht genügend Protein zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der Untersuchung mit 10 μ M CX-4945 sind in Abb. 9 dargestellt.

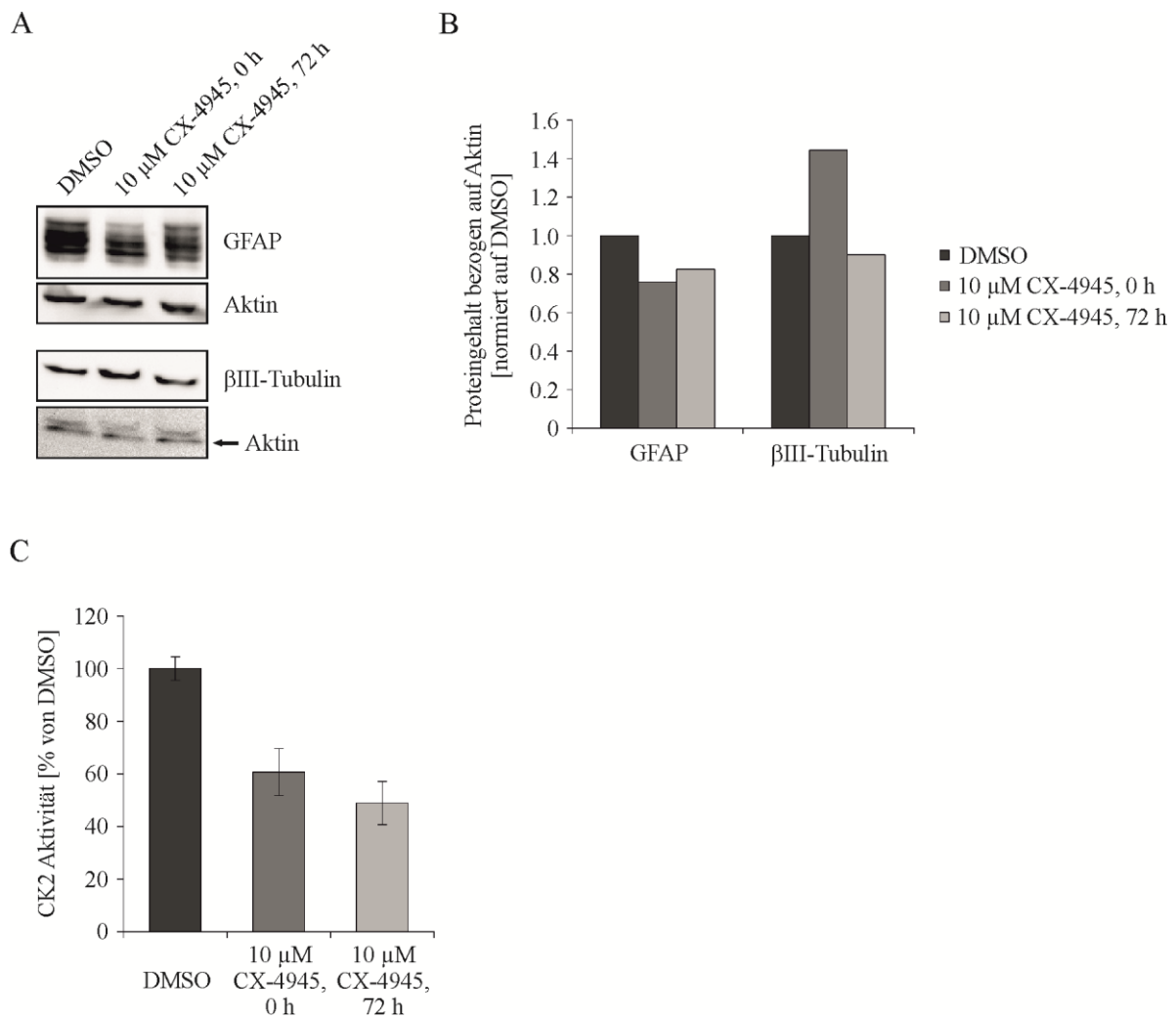


Abbildung 9: Western Blot Analyse der neuronalen und glialen Differenzierung nach Hemmung mit CX-4945 und Überprüfung der Hemmeffizienz. Eine Million SVZ-Einzelzellen werden in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und durch Zugabe von 20 μ M Retinsäure differenziert. Dem Differenzierungsmix werden DMSO oder 10 μ M CX-4945 (direkt oder nach 72 h) zugesetzt. Die Zellen werden an Tag 5 der Differenzierung geerntet und es werden Gesamtzellextrakte davon hergestellt. (A) Je 10 μ g (GFAP) und 50 μ g (β III-Tubulin) Proteine werden in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Expression der Markerproteine GFAP und β III-Tubulin wird mithilfe der spezifischen Antikörper Z0334 und MAB1637 untersucht. Als Ladekontrolle dient Aktin, das mit dem Antikörper sc-1615 nachgewiesen wird. (B) Densitometrische Quantifizierung der in (A) dargestellten Banden mit der Software Quantity One 4.6.5. Die Werte werden auf Aktin bezogen. Die Intensität der DMSO-Kontrolle ist als Referenz (1.0) gewählt. (C) Aktivitätsbestimmung der CK2 aus je 20 μ g Gesamtzellextrakt mittels *in vitro*-CK2-Kinaseaktivitäts-Assay. Die erhaltenen cpm-Werte sind auf DMSO normiert (100%).

Die in Abb. 9 A für GFAP und β III-Tubulin dargestellten Expressionslevel, sowie deren Quantifizierung in Abb. 9 B, bestätigen die mit der Immunfluoreszenz-Untersuchung

erhaltenen Ergebnisse (Abb. 8). Nach Hemmung der CK2 mit 10 μ M CX-4945 von Beginn der Differenzierung an (0 h) ist die Expression von GFAP um 25% erniedrigt, während die β III-Tubulin Menge deutlich erhöht ist. Hemmt man die CK2 erst 72 h nach Beginn der Differenzierung, ist die GFAP-Expression immer noch erniedrigt, der β III-Tubulin Gehalt ist jedoch wieder annähernd auf Höhe der DMSO-Kontrolle. Die Bestimmung der CK2-Aktivität (Abb. 9 C) zeigt eine Restaktivität von 61% wenn die CK2 von Beginn der Differenzierung an gehemmt wird und von 49% bei Hemmung ab 72 h. Die Restaktivität in differenzierenden Neurosphären liegt somit höher als die in den proliferierenden SVZ (31%, s. Abb. 6).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Hemmung der CK2 unabhängig vom verwendeten Inhibitor und dem Zeitpunkt der Hemmung eine Reduktion der Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Astrozyten bewirkt, wenn auch in unterschiedlichem Maß. Die Differenzierung zu Neuronen hingegen ist abhängig von Inhibitor und Hemmungszeitpunkt. Eine Hemmung der CK2 ab 72 h nach Beginn der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die Anzahl und Morphologie der Neurone. Bei einer Hemmung der CK2 ab Beginn der Differenzierung zeigt sich mit 10 μ M CX-4945 eine Zunahme der Neuronenzahl und mit 40 μ M Q eine drastische Reduktion der Neurone mit teilweise anormaler Morphologie.

Die Proteinkinase CK2 spielt also bei der postnatalen neuralen Differenzierung eindeutig eine Rolle. Ihren Einfluss übt sie zu Beginn der Differenzierung aus, da eine Hemmung zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss mehr auf die Differenzierung hat.

6.1.4 Einfluss der CK2 auf die Stammzellpopulation

Der für meine Untersuchungen eingesetzte CK2-Hemmstoff CX-4945 wird zurzeit als Tumorthapeutikum eingesetzt. Bislang ist noch nicht bekannt, ob CX-4945 die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann [134], doch gibt es außerhalb des ZNS im adulten Tier ebenfalls neurale Stammzellnischen, wie z.B. im enterischen Nervensystem [135] oder dem Glomus caroticum [136], die durch eine Hemmung der CK2 beeinflusst werden könnten. Deshalb ist es neben der Differenzierung auch interessant zu wissen, wie sich die Hemmung der CK2 auf die Stammzellpopulation auswirkt.

Die Aussaat und Behandlung der Neurosphären erfolgt parallel zu der in 6.1.3 beschriebenen Untersuchung zur GFAP- und β III-Tubulin-Expression. Zur Darstellung der Stammzellen wird das Markerprotein Nestin in der Immunfluoreszenz angefärbt. Da zuvor durch die Hemmung der CK2 eine verminderte Differenzierung von Astrozyten (und bei Q auch von Neuronen) beobachtet werden konnte, sollte Nestin in den inhibierten Kulturen nicht so stark

durch die Differenzierungsmarker ersetzt worden sein und dementsprechend stärker exprimiert werden. Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung.

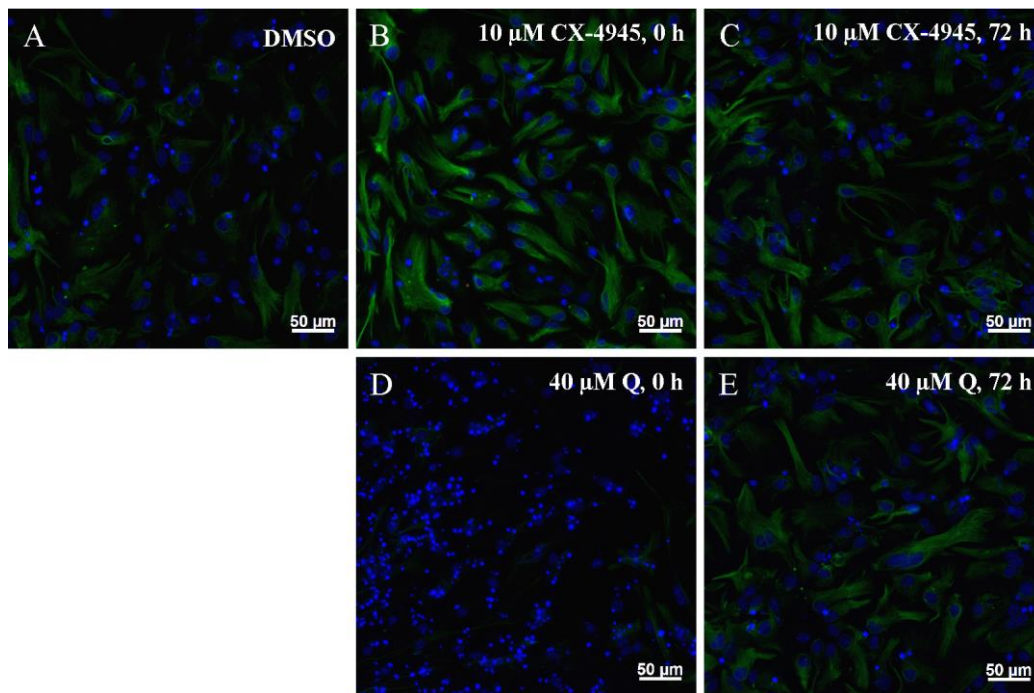


Abbildung 10: Einfluss der CK2-Inhibitoren CX-4945 und Quinalizarin (Q) auf die Stammzellpopulation der SVZ-Neurosphären. SVZ-Neurosphären werden auf ECM-beschichteten Deckgläschen ausgesät und die Differenzierung wird durch Zugabe von 20 µM Retinsäure induziert. Die Inhibitoren (10 µM CX-4945 und 40 µM Q) werden entweder direkt zum Differenzierungsmix hinzugegeben (0 h, B, D) oder erst 72 h nach Differenzierungsbeginn appliziert (C, E). DMSO dient als Kontrolle (A). Die Zellen werden an Tag 5 der Differenzierung fixiert und der Stammzellcharakter durch Färbung von Nestin überprüft. Nestin wird mit dem monoklonalen Mausantikörper MAB353 detektiert und mithilfe des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 Esel-Anti-Maus-IgG sichtbar gemacht. Die Kerne sind mit DAPI angefärbt. Gesamtvergrößerung: 200x, Maßstabsbalken 50 µm. Die Belichtungszeit wurde an undifferenzierte Neurosphären angepasst.

Wie erwartet ist die Nestin-Expression in der DMSO-Kontrolle (Abb. 10 A) niedrig, was für eine Differenzierung der Zellen spricht. Die beiden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 10 µM CX-4945 gehemmten Kulturen (Abb. 10 B, C) zeigen eine stärkere Nestin-Färbung, wobei die Färbung der nach 72 h Differenzierung inhibierten Kultur schwächer ist. Diese Beobachtung passt zu der reduzierten astrozytären Differenzierung, die in Abb. 8 und 9 nachgewiesen werden konnte. Je höher die Zahl der Astrozyten, desto schwächer die Nestin-Expression. Dementsprechend sollte die Neurosphären-Kultur, die von Beginn der Differenzierung an mit 40 µM Q behandelt wurde, die höchste Nestin-Expression aufweisen, da sie weniger Astrozyten und deutlich weniger Neurone als die DMSO-Kontrolle ausgebildet

hat (Abb. 8 D, F). Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die Nestin-Expression ist kaum nachweisbar. Auch hier lassen sich apoptotische DAPI-Kerne beobachten. Beginnt die Q-Behandlung erst 72 h nach Start der Differenzierung ist die beobachtete Nestin-Färbung vergleichbar mit der CX-4945-Behandlung nach 72 h, deutet also ebenfalls auf eine reduzierte Differenzierung im Vergleich zu DMSO hin.

6.1.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose nach CK2-Hemmung

Wie bereits erwähnt, konnte Frau Bender mit 20 μ M CX-4945 einen toxischen Effekt auf die differenzierenden Neurosphären nachweisen [128]. Da mit dem Hemmstoff Q ebenfalls der Verdacht auf eine Induktion der Apoptose besteht und die Beobachtung einer potentiellen Toxizität der Hemmstoffe allein durch die DAPI-Färbung nicht besonders aussagekräftig ist, wird im nächsten Schritt die Entstehung von Apoptose in den differenzierten Neurosphären-Kulturen untersucht.

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgt mit Hilfe des "In Situ Cell Death Detection Kits, Fluorescein" der Firma Roche. Dabei handelt es sich um den sogenannten TUNEL-Assay, bei dem die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall Fluorescein (grün), markiert werden. Die Neurosphären werden analog zur GFAP/ β III-Tubulin- und Nestin-Färbung ausgesät und differenziert. An Tag 5 der Differenzierung werden die Zellen fixiert, und wie in 5.4.14 beschrieben, mit dem TUNEL-Reagenz gefärbt. Die DNA des Zellkerns wird mit DAPI angefärbt. Die Detektion des Fluoresceins erfolgt mikroskopisch durch das GFP-Filterset (Abb. 11).

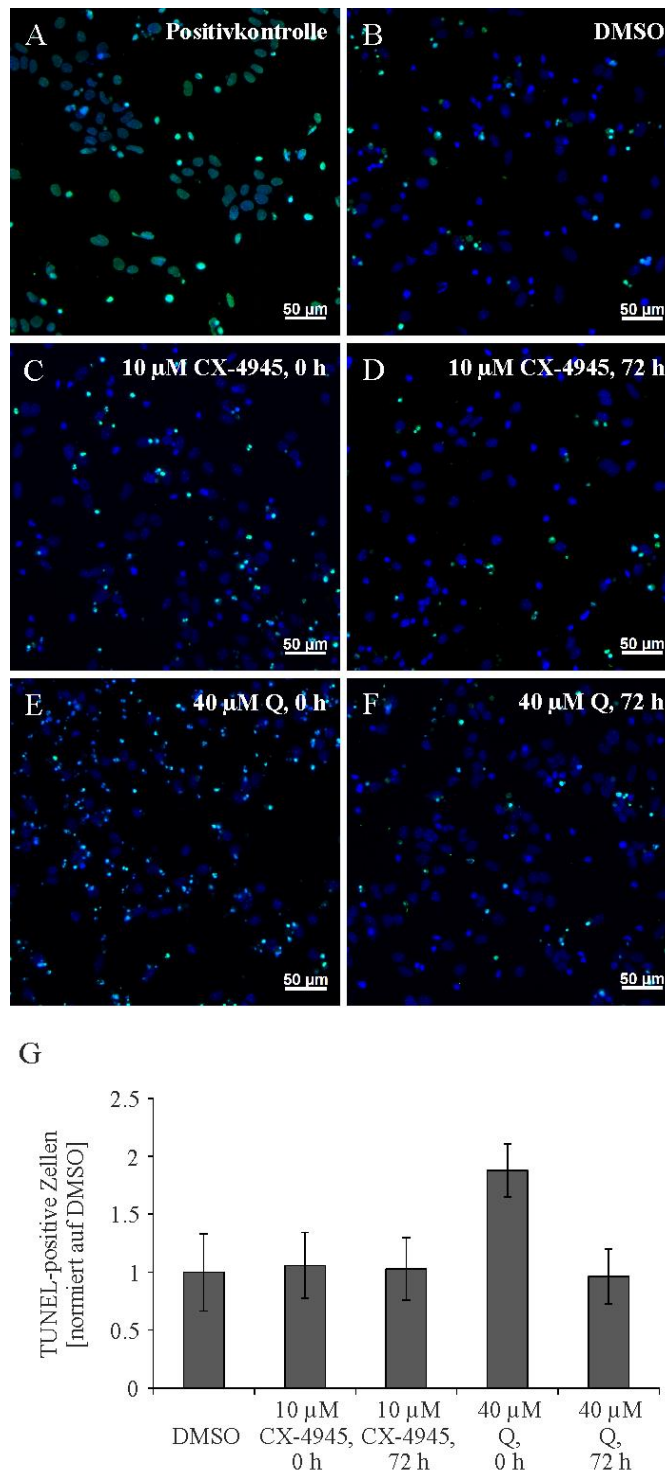


Abbildung 11: TUNEL-Färbung der SVZ-Neurosphären zur Überprüfung der Apoptose-Induktion durch die Inhibitoren CX-4945 und Quinalizarin (Q). SVZ-Neurosphären werden auf ECM-beschichteten Deckgläsern ausgesät und durch Zugabe von 20 µM Retinsäure zum Medium differenziert. Der Differenzierungsmix enthält entweder DMSO (B), 10 µM CX-4945 (C) oder 40 µM Q (E). Zwei weitere Ansätze erhalten die CK2-Inhibitoren erst 72 h nach Beginn der Differenzierung (D, F). Alle Kulturen werden an Tag 5 der Differenzierung fixiert. Zur TUNEL-Färbung werden die Zellen permeabilisiert und 1 h mit dem TUNEL-Reaktionsmix bei 37°C inkubiert. Die Färbung der Kerne erfolgt anschließend durch das Eindecken in ProLong® Diamond Antifade Mountant mit DAPI (blau). Das Fluorescein-Signal wird mit dem GFP-Filterset

des Axiovert 100 Mikroskops detektiert (grün). Die Positivkontrolle (A) wird für 10 Minuten bei 37°C mit 3 U DNase I inkubiert. (G) Quantitative Darstellung der TUNEL-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI + TUNEL). Die Anzahl der Fluorescein-Signale in der Kontrolle (DMSO) ist als Referenz (1.0) gewählt. Zur Berechnung der Verteilung wurden je 15 zufällige Bildausschnitte einer 320x-Vergrößerung ausgezählt.

In der in Abb. 11 A dargestellten Positivkontrolle wurde die komplette DNA durch DNase I zerschnitten. Dementsprechend sind alle Kerne grün angefärbt. Im Vergleich dazu weist die DMSO-Kontrolle (Abb. 11 B) nur wenige grüne Spots auf und diese befinden sich eher in Kernen, die bereits ein blasenförmiges Aussehen besitzen und nicht in solchen mit gesunder Morphologie. Die mit 10 µM CX-4945 behandelten Neurosphären-Kulturen (Abb. 11 C, D) unterscheiden sich nicht von der DMSO-Kontrolle, was die Auszählung der TUNEL-positiven Zellen (Abb. 11 G) bestätigt. Bei den von Beginn der Differenzierung an mit 40 µM Q behandelten Zellen in Abb. 11 E, erkennt man eine deutlich erhöhte Anzahl an TUNEL-Signalen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Auszählung ergibt eine 1.9-fache Erhöhung der Apoptoserate. Diese Erhöhung ist nicht vorhanden wenn der Hemmstoff erst 72 h nach Beginn der Differenzierung zugegeben wird (Abb. 11 F).

Die Untersuchung der Apoptoseinduktion mithilfe des TUNEL-Assays bestätigt die bereits vermutete Toxizität des Hemmstoffs Quinalizarin bei Zugabe von Beginn der Differenzierung an. Dieses Ergebnis erklärt auch die fehlende Nestin-Färbung in Abb. 10 D. Gibt man Q erst 72 h nach Beginn der Differenzierung hinzu, scheinen die Zellen jedoch eine gewisse Unempfindlichkeit entwickelt zu haben. Der Hemmstoff CX-4945 ist in einer Konzentration von 10 µM erwartungsgemäß nicht toxisch.

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Proteinkinase CK2 die Differenzierung postnataler neuraler Stammzellen der SVZ beeinflusst. Die Hemmung zeigt dabei den größten Effekt, wenn sie von Beginn der Differenzierung an erfolgt. Bei der Wahl des Inhibitors sollte die eingesetzte Konzentration beachtet werden, da offensichtlich vor allem die neuronalen Stammzellen und die daraus entstehenden Neurone sehr empfindlich auf eine starke CK2-Hemmung mit Apoptose reagieren. Diese Erkenntnisse sind auch im Hinblick auf den Einsatz von CK2-Inhibitoren in der Tumorthherapie bedeutsam, da mögliche schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten könnten. Im Falle der neuronalen Differenzierung könnte dies die Regeneration beschädigter Hirnareale betreffen, da die SVZ sowie der *Gyrus dentatus* daran beteiligt sind [137]. Davon abgesehen könnten auch andere postnatale Differenzierungsprozesse betroffen sein, weshalb nun als weiteres System die Rolle der CK2 während der Adipogenese untersucht werden soll.

6.2 CK2 und Adipogenese - Ergebnisse in hMSC

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind primäre Zellen, die das Potential zur Selbsterneuerung besitzen und in Gewebszellen mit mesodermalem Ursprung differenzieren können. Im adulten Organismus dienen sie dem Erhalt vorhandener Strukturen, ersetzen also tote oder beschädigte Zellen. Sie können aus mehreren Bereichen des Körpers, wie z.B. dem Knochenmark oder dem Fettgewebe, isoliert und *in vitro* kultiviert werden [27]. In dieser Arbeit werden hMSC aus dem Knochenmark verwendet, um die Rolle der CK2 auf die adipogene Differenzierung zu untersuchen. Sie wurden vom Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik IBMT in St. Ingbert aus dem Hüftkopf isoliert und besitzen die von der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) definierten MSC-Eigenschaften [138]. Für die postnatale Differenzierung von NSC aus dem Mausgehirn wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine Beteiligung der Proteinkinase CK2 bestätigt. Auch bei der Adipogenese der Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 konnte bereits beobachtet werden, dass eine Hemmung der CK2 die Differenzierung unterdrückt [113]. Nun stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der CK2 im primären System der hMSC ähnliche Ergebnisse hervorbringt. Die hMSC eignen sich für solche Untersuchungen besonders gut, da sie *in vivo* den Ursprung neuer Fettzellen darstellen und somit, auch wenn sie *in vitro* kultiviert werden, dem menschlichen System am nächsten sind.

6.2.1 Vorstellung des Differenzierungssystems

Zunächst wird ein Überblick über die Differenzierung der hMSC zu Adipozyten gegeben (Abb. 12). Im Gegensatz zur Zelllinie 3T3-L1, bei denen eine komplette Differenzierung 12 Tage dauert, sind die hMSC noch nicht determiniert und benötigen daher 21 Tage. Die Induktion der Differenzierung erfolgt bei Erreichen der Konfluenz durch Zugabe von IBMX, Dexamethason, Indometacin und Insulin. Der Differenzierungsmix wird alle 3 Tage erneuert, damit die Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt sind und einen dauerhaften Differenzierungsstimulus erhalten. An die Determinierung schließt sich die terminale Differenzierung an. Möglicherweise erfolgt dazwischen eine mitotische klonale Expansion, die jedoch bei den hMSC nicht unbedingt benötigt wird [139]. An Tag 21 ist die Differenzierung abgeschlossen und die Lipidtröpfchen der reifen Adipozyten können zur besseren Identifikation mit dem lipophilen Azofarbstoff Oil Red O rot angefärbt werden.

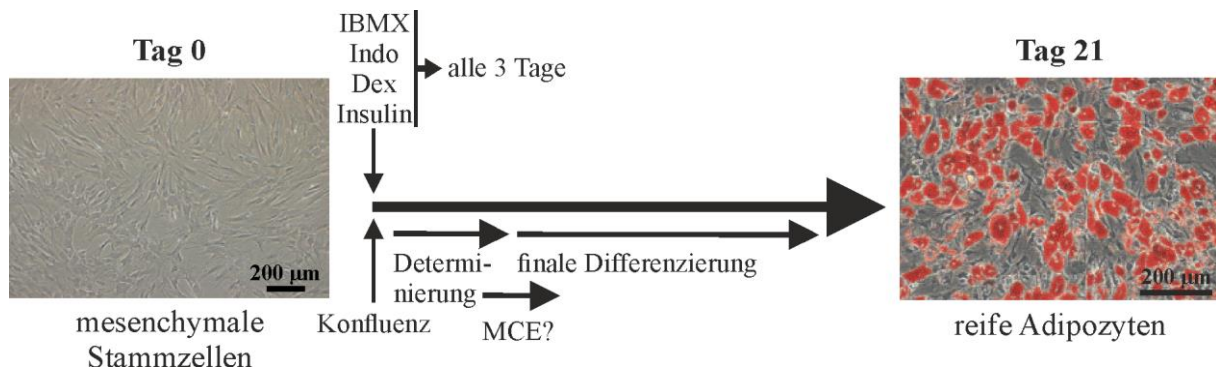


Abbildung 12: Schema der Differenzierung zu Adipozyten in hMSC. Bei Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wird die adipogene Differenzierung durch Zugabe von IBMX, Indometacin (Indo), Dexamethason (Dex) und Insulin induziert. Der Differenzierungsmix wird alle 3 Tage erneuert. Über die Dauer von 21 Tagen erfolgt zunächst die Determinierung, anschließend möglicherweise eine mitotische klonale Expansion (MCE) und schließlich die finale Differenzierung zu reifen Adipozyten. Die Lipidtröpfchen der Adipozyten sind mit Oil Red O angefärbt. Maßstab 200 µm. Die Durchlicht-Aufnahmen wurden von Frau Dr. Nadine Wilhelm angefertigt.

Im nächsten Schritt sollen die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung untersucht werden. Dazu werden die hMSC ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird durch Zugabe des Differenzierungsmixes die Differenzierung eingeleitet. Die Zellen werden alle 3 Tage mikroskopisch hinsichtlich möglicher Veränderungen untersucht und die Veränderungen durch Phasenkontrast-Aufnahmen dokumentiert (Abb. 13).

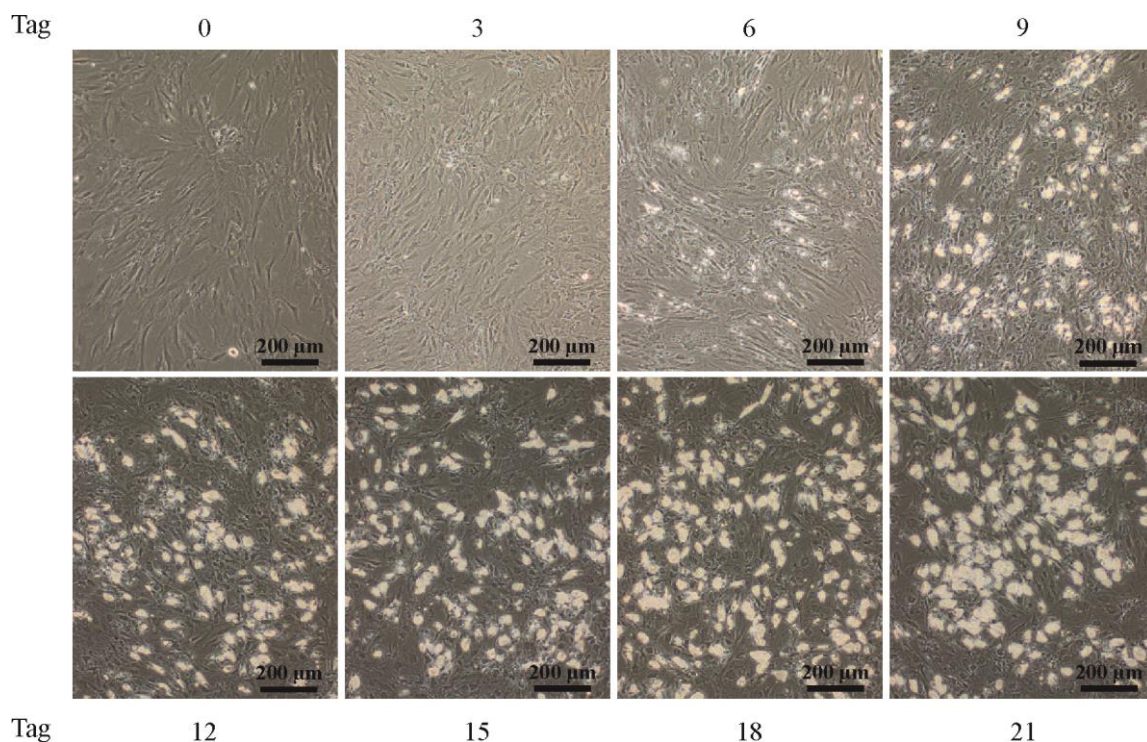


Abbildung 13: Mikroskopische Dokumentation der adipogenen Differenzierung von hMSC. Die hMSC werden ausgesät (15000 Zellen / cm²) und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Alle drei Tage, begonnen bei Tag 0, wird der Differenzierungsstatus durch eine Phasenkontrast-Aufnahme am Mikroskop dokumentiert. Maßstab Balken 200 µm. Die Aufnahmen wurden von Frau Dr. Nadine Wilhelm angefertigt.

In Abb. 13 lässt sich beobachten, dass die hMSC an Tag 0 eine längliche, fibroblasten-ähnliche Morphologie besitzen. Im Verlauf der Differenzierung nehmen sie eine runde Form an und es bilden sich mehrere Lipidvakuolen im Cytoplasma aus, die als helle Kugeln auszumachen sind. Die Lipidvakuolen bilden sich ab Tag 6 aus und nehmen bis Tag 21 in Größe und Anzahl zu.

6.2.2 Untersuchungen zur CK2 während der Differenzierung

Nach der erfolgreichen Etablierung der adipogenen Differenzierung in den hMSC, wird im Anschluss der Zustand der CK2 während der Differenzierung untersucht. In 3T3-L1 Zellen steigt die CK2-Expression und -Aktivität initial an und fällt dann ab Tag 4/6 bis zum Ende der Differenzierung relativ stark ab [113]. Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Expression und die Aktivität der CK2 in hMSC ähnlich verhalten wie in 3T3-L1 Zellen. Zusätzlich dazu wird die subzelluläre Lokalisation der CK2 untersucht.

6.2.2.1 Die Expression der CK2

Zur Analyse der CK2-Expression während der Differenzierung werden hMSC in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Zum Zeitpunkt der Konfluenz wird die Differenzierung mittels Differenzierungsmix induziert. Alle drei Tage, begonnen bei Tag 0, werden die hMSC von einer Kulturschale geerntet, Gesamtzellextrakte hergestellt und gleiche Proteinmengen auf einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran kann die Expression der CK2-Untereinheiten mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Zusätzlich zur CK2 wird das Markerprotein Perilipin detektiert, dessen Expression eine erfolgreiche Differenzierung nachweist. Bei Perilipin handelt es sich um ein Adipozyten-spezifisches Protein, das an der Entstehung der Lipidtröpfchen beteiligt ist, sie schützend umhüllt und den Zugang der Lipasen bei der Lipolyse regelt [140, 141]. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

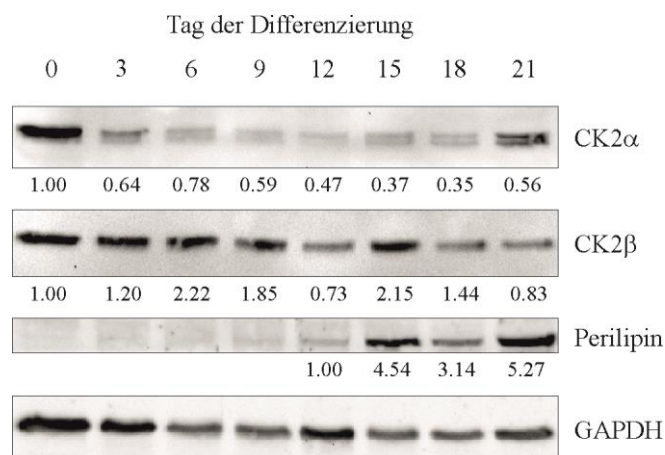


Abbildung 14: Expression der CK2-Untereinheiten und des Differenzierungsmarkers Perilipin im Verlauf der Differenzierung. Die hMSC werden in einer Dichte von 15000 Zellen / cm² in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Alle 3 Tage werden die Zellen einer Schale geerntet und Gesamtzellextrakte davon hergestellt. Je 50 µg Protein werden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der CK2-Untereinheiten erfolgt mit den monoklonalen Mausantikörpern 1A5 und 6D5. Perilipin und die Ladekontrolle GAPDH werden mit den polyklonalen Kaninchenantikörpern #3470 und sc-25778 detektiert. Die Expressionsstärke wird mit der Software Quantity One 4.6.5 auf GAPDH bezogen quantifiziert. Die Intensität an Tag 0 bzw. Tag 12 (Perilipin) wurde als Referenz (1.00) gewählt. Die entsprechenden Zahlen befinden sich unterhalb der jeweiligen Banden.

Das in Abb. 14 dargestellte Expressionsprofil der CK2-Untereinheiten zeigt, dass die CK2α-Expression unter Berücksichtigung leichter Schwankungen mit fortschreitender Differenzierung abnimmt. Die Expression von CK2β ist über einen Großteil der Differenzierung erhöht. Lediglich die Tage 12 und 21 zeigen eine leicht verminderte Expression. Das Markerprotein Perilipin lässt sich erstmalig an Tag 12 nachweisen und nimmt dann mit fortschreitender Adipogenese zu, was für eine erfolgreiche Differenzierung spricht.

6.2.2.2 Die Aktivität der CK2

Die Analyse der CK2-Aktivität erfolgt ebenfalls aus Gesamtzellextrakt parallel zur Bestimmung der Expression. Gleiche Proteinmengen werden einem *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay unterzogen (Abb. 15).

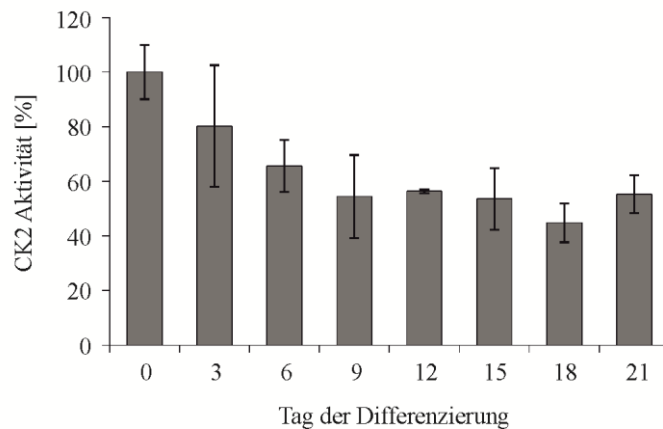


Abbildung 15: CK2-Aktivität im Verlauf der Differenzierung. Die hMSC werden in einer Dichte von 15000 Zellen / cm² in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Alle 3 Tage werden die Zellen von einer Kulturschale geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Gleiche Proteinmengen werden mit [³²P]-γ-ATP und dem CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Menge an eingebautem radioaktivem Phosphat wird in einem Szintillationszähler detektiert. Dargestellt ist die prozentuale CK2-Aktivität bezogen auf Tag 0. Die Standardabweichung ergibt sich aus mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Aktivität der CK2 nimmt analog zur Proteinmenge von CK2α im Laufe der Differenzierung ab. An Tag 9 fällt die Aktivität auf etwa 55% des Ausgangswertes und unterliegt danach nur noch geringen Schwankungen.

Die in den hMSC für die Expression und Aktivität der CK2 erhaltenen Ergebnisse weichen also zum Teil von den Ergebnissen der 3T3-L1 ab. Zwar wird die Aktivität während der Differenzierung herunterreguliert, der in den 3T3-L1 beobachtete Anstieg der Aktivität am Beginn fehlt jedoch. Zudem zeigen die 3T3-L1 das gleiche Expressionsmuster für alle CK2-Untereinheiten. Die hMSC weisen ein unterschiedliches Muster für CK2α und β auf. Auch wenn es sich bei beiden Zellen um das gleiche Differenzierungsmodell handelt, gibt es doch Unterschiede, die bei den Untersuchungen berücksichtigt werden müssen.

6.2.2.3 Die subzelluläre Lokalisation der CK2

Die subzelluläre Lokalisation der CK2-Untereinheiten spielt eine große Rolle für ihre Funktion. Es gibt drei Klassen von CK2-Substraten. Solche, die sowohl von den freien katalytischen Untereinheiten als auch vom Holoenzym phosphoryliert werden können (I), solche, die nur von freien CK2α/α' (II) und solche, die nur vom Holoenzym phosphoryliert werden können (III) [142]. Klasse III-Substrate machen dabei den größten Teil aus. Zur

Bildung des Holoenzymms müssen sich CK2 α und CK2 β im gleichen Zellkompartiment befinden. Man geht davon aus, dass sich automatisch Holoenzyme aus den freien Untereinheiten ausbilden, sobald sich beide Untereinheiten in räumlicher Nähe zueinander befinden [143-145]. Je nachdem, ob sich also beide im gleichen Zellkompartiment befinden (Holoenzym) oder sie räumlich getrennt sind (Monomere), werden unterschiedliche Substrate phosphoryliert. Deshalb wird die subzelluläre Lokalisation von CK2 α und CK2 β bestimmt.

Dazu werden hMSC in Nunc[®] Lab-Tek[®] 8-Loch Permanox[®]-Slides ausgesät und über einen Zeitraum von 21 Tagen differenziert. Alle 3 Tage, begonnen bei Tag 0, werden die Zellen eines "Slides" fixiert. Die CK2-Untereinheiten werden mit spezifischen Antikörpern detektiert und durch Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Das Markerprotein Perilipin wird in einem parallelen Ansatz nachgewiesen und dient als Kontrolle einer erfolgreichen Differenzierung. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

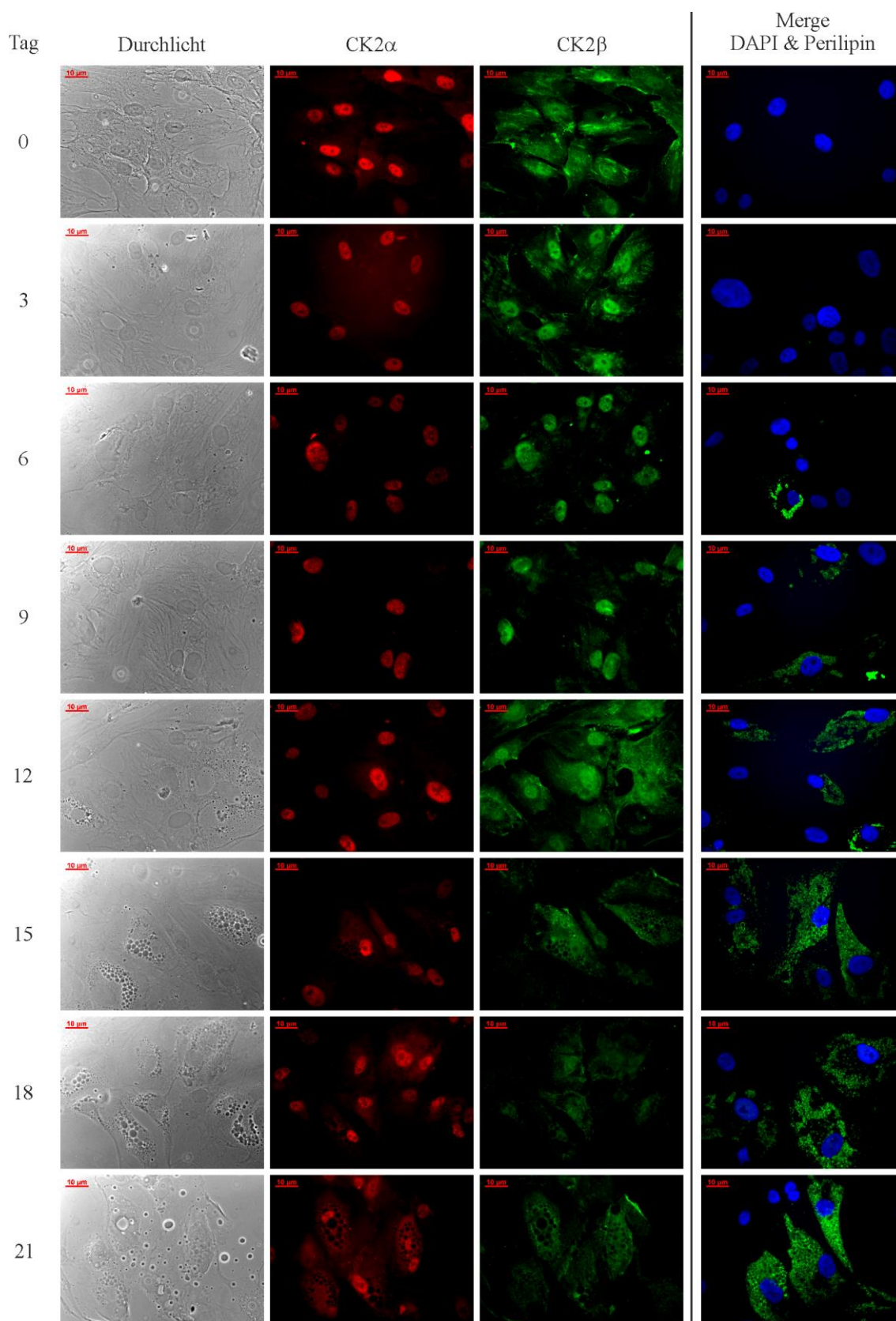


Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation der CK2 und des Markerproteins Perilipin im Verlauf der Differenzierung der hMSC. Die hMSC werden in Nunc® Lab-Tek® 8-Loch Permanox®-Slides ausgesät (12000 Zellen / Loch). Bei Erreichen der Konfluenz werden die Zellen eines "Slides" fixiert (Tag 0) und in den

restlichen Zellen die Differenzierung induziert. Alle 3 Tage werden die Zellen eines weiteren "Slides" fixiert. Die Zellen werden permeabilisiert und mit den Primärantikörpern 1A5 gegen CK2 α , Serum #32 gegen CK2 β und #3470 gegen Perilipin über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper werden die Alexa Fluor 546 Ziege-Anti-Maus- und Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugate verwendet. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Die dargestellte Verteilung der CK2-Untereinheiten und des Perilipins wurden in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Gesamtvergrößerung: 400x (Öl), Maßstabbalken 10 μ m.

Zu Beginn der Differenzierung (Tag 0) ist CK2 α hauptsächlich im Kern und nur wenig im Cytoplasma lokalisiert. Die räumliche Verteilung von CK2 α bleibt auch während der kompletten Differenzierung hauptsächlich nukleär. Vom und zum Cytoplasma findet im Verlauf des Differenzierungsvorgangs ein schwaches "shuttling" statt, was sich darin äußert dass an Tag 6 und 9 keine CK2 α mehr im Cytoplasma vorkommt und ab Tag 12 wieder vereinzelt eine leichte Färbung des Cytoplasmas erkennbar ist, die bis Tag 21 zunimmt. Für CK2 β findet ebenfalls ein "shuttling" zwischen Kern und Cytoplasma statt, das jedoch wesentlich stärker ausgeprägt ist. An Tag 0 ist die β -Untereinheit gleichmäßig ubiquitär lokalisiert. Diese ubiquitäre Verteilung wird bis Tag 9 zunehmend kernlastiger, sodass kaum noch CK2 β im Cytoplasma vorhanden ist. Danach findet bis Tag 21 ein entgegengesetztes "shuttling" in Richtung Cytosol statt und an Tag 21 findet sich kaum noch CK2 β im Kern. Ob es sich tatsächlich um ein "shuttling" handelt kann nicht genau gesagt werden, da die Zunahme im Cytoplasma auch durch Neusynthese der Untereinheiten bedingt sein könnte. Der Differenzierungsmarker Perilipin lässt sich ab Tag 6 in einzelnen Zellen nachweisen. Seiner Funktion entsprechend umschließt er die Lipidtröpfchen, was als dreidimensionaler Ring sichtbar wird. Von Tag 6 an nimmt die Anzahl der Fettzellen und die Anzahl der Lipidtröpfchen pro Zelle zu, was belegt dass die Differenzierung erfolgreich verlaufen ist. Die Lipidvakuolen können auch in den Durchlicht-Aufnahmen ab Tag 12 beobachtet werden.

6.2.3 Ermittlung der optimalen Hemmstoffkonzentration in proliferierenden hMSC

Nach der Analyse des Verhaltens der CK2 während einer regulären Differenzierung besteht der nächste Schritt nun darin, den Einfluss der CK2-Hemmung auf die Differenzierung zu untersuchen. Bevor dies jedoch geschehen kann, muss zunächst ausgetestet werden, welche Konzentration an Hemmstoff verwendet werden kann, da jede Zellpopulation anders auf die Hemmstoffe reagiert und anspricht. Es gilt diejenige Konzentration herauszufinden, die den geringsten Einfluss auf die Zellen besitzt und gleichzeitig eine effektive Hemmung der CK2

bewirkt. Dazu wird in proliferierenden hMSC nach Hemmung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren Q und CX-4945 die Zellviabilität mittels MTT-Assay sowie die Effizienz der Hemmung mittels *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay bestimmt. In Voruntersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Q die Differenzierung in einer Konzentration von 30 μM effektiv hemmt, wodurch die Hemmung der CK2-Aktivität auch nur für diese Konzentration überprüft wird.

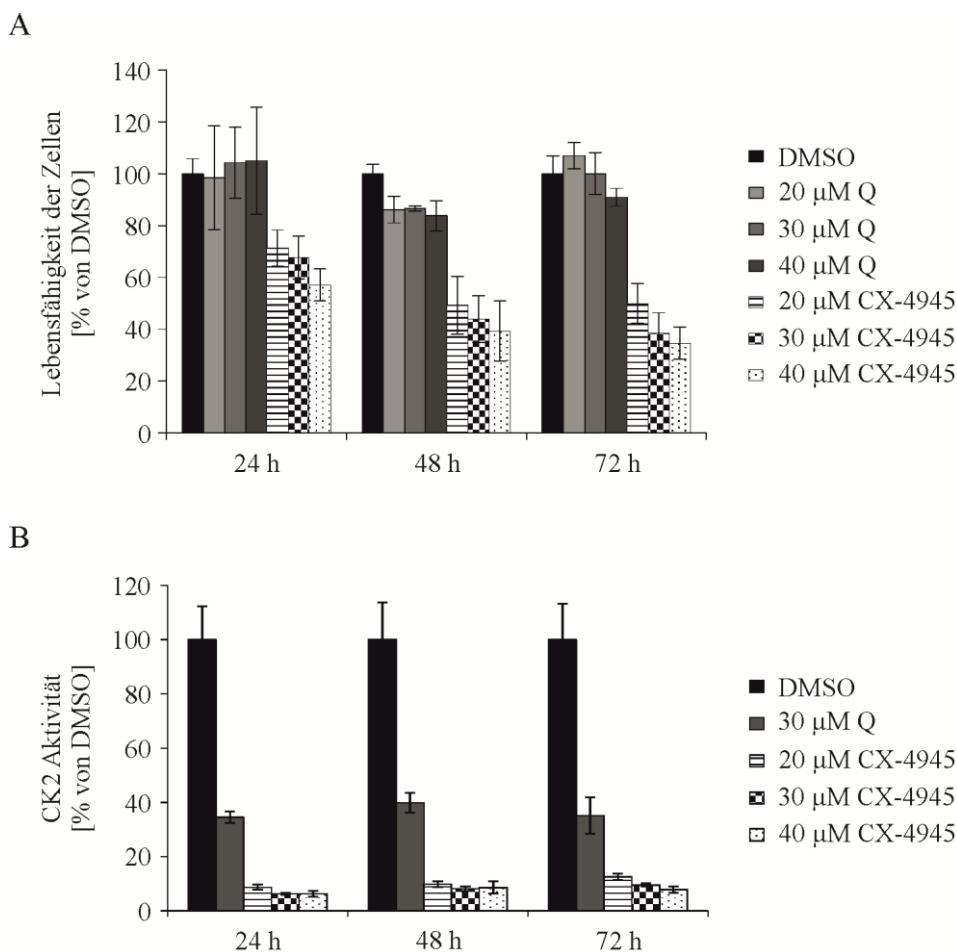


Abbildung 17: Bestimmung der Lebensfähigkeit und CK2-Aktivität in proliferierenden hMSC nach Hemmung mit Quinalizarin (Q) und CX-4945. (A) Die hMSC werden in einer Dichte von 10000 Zellen / cm^2 in 24 Loch-Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag werden sie mit DMSO, 20-40 μM Q oder 20-40 μM CX-4945 behandelt. Je 24, 48 und 72 h nach Beginn der Behandlung wird die Lebensfähigkeit mittels MTT-Assay überprüft. Die gemessenen Werte der gehemmten Zellen werden auf DMSO (100%) normiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Die hMSC werden subkonfluent ausgesät und mit DMSO, 30 μM Q oder 20-40 μM CX-4945 behandelt. Je 24, 48 und 72 h nach Beginn der Behandlung werden die Zellen geerntet. Es werden Gesamtzellextrakte hergestellt und von gleichen Proteinmengen wird mittels *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay die CK2-Aktivität bestimmt. Die gemessenen Werte werden auf DMSO (100%) normiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der in Abb. 17 A dargestellten Lebensfähigkeit der hMSC nach der Behandlung mit den CK2 Inhibitoren Q und CX-4945 in steigenden Konzentrationen zeigt einen unterschiedlichen Einfluss der Inhibitoren. Die hMSC lassen unabhängig von der eingesetzten Konzentration an Q keine bis nur geringe Reduktion der Viabilität (48 h) erkennen. CX-4945 hingegen besitzt einen zeit- und dosisabhängigen Effekt. Bereits nach 24 h sinkt die Lebensfähigkeit der mit 20 μ M CX-4945 behandelten Zellen auf etwa 70%; nach 72 h sind es nur noch 50%. Bei einer Behandlung mit 40 μ M CX-4949 beträgt die Lebensfähigkeit nach 72 h sogar nur noch 35% verglichen mit DMSO. Obwohl die Zellen durch Q nicht in ihrer Viabilität beeinflusst werden, reduziert es in einer Konzentration von 30 μ M die CK2-Aktivität über die Dauer von 72 h gleichmäßig, sodass die Restaktivität unter 40% bleibt (Abb. 17 B). CX-4945 ist sogar noch effizienter. Es reduziert die Kinaseaktivität dauerhaft auf unter 15% Restaktivität, wobei es zwischen den Konzentrationen keine großen Unterschiede gibt.

Da die Hemmeffizienz mit 20 μ M CX-4945 sehr gut ist und es den geringsten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat, wird diese Konzentration für die Differenzierungsexperimente verwendet. Für Q spricht nichts dagegen, die Konzentration von 30 μ M beizubehalten, da die Hemmung gut und der Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen schwach ist.

6.2.4 Untersuchungen zur Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Differenzierung

6.2.4.1 Analyse des Differenzierungsstatus

Nun, da die am besten geeigneten Hemmstoffkonzentrationen bekannt sind, kann der Einfluss einer CK2-Hemmung auf die Differenzierung untersucht werden. Die einfachste Methode, dies zu untersuchen, ist die Differenzierung in Anwesenheit des Hemmstoffs durchzuführen und zu beobachten ob die Zellen zu Adipozyten differenzieren oder nicht. Dazu werden hMSC ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Dem Differenzierungsmix wird dabei dauerhaft entweder DMSO (Lösemittelkontrolle), 20 μ M CX-4945 oder 30 μ M Q zugesetzt. Die eingesetzte Menge an DMSO richtet sich dabei nach der maximalen Hemmstoffmenge. Die Differenzierung wird regelmäßig mikroskopisch verfolgt und es werden Phasenkontrast-Aufnahmen angefertigt. Am Tag 21 erfolgt zur besseren Visualisierung die Anfärbung der Lipidvakuolen mit dem Farbstoff Oil Red O.

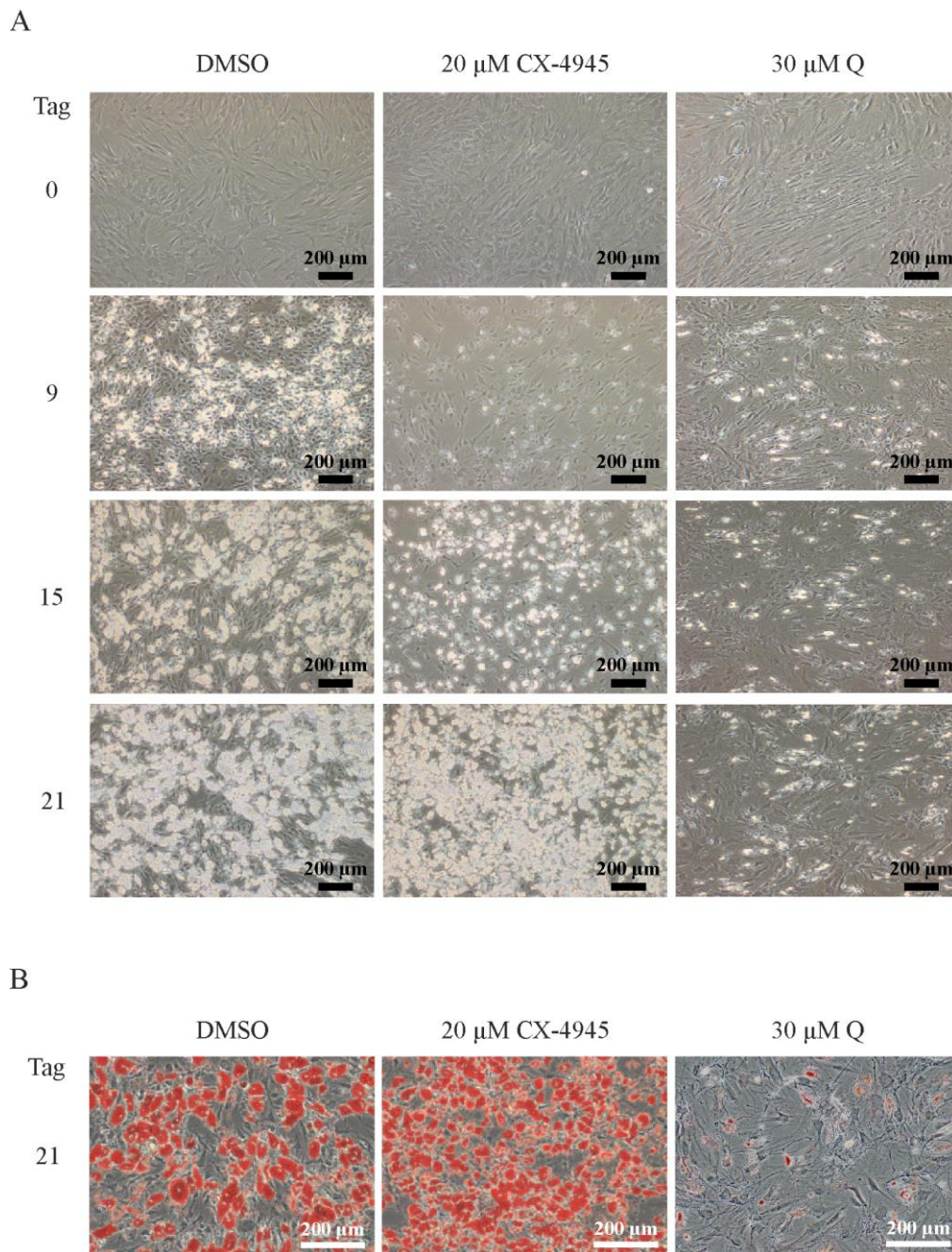


Abbildung 18: Mikroskopische Dokumentation der Differenzierung der hMSC und Analyse des Differenzierungsstatus an Tag 21 nach Hemmung der CK2 mit Quinalizarin (Q) und CX-4945. Die hMSC werden in einer Dichte von 15000 Zellen / cm^2 ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz durch Medienwechsel zu Differenzierungsmix mit DMSO, 20 μ M CX-4945 oder 30 μ M Q differenziert. (A) An Tag 0, 9, 15 und 21 wird der Differenzierungsstatus durch eine Phasenkontrast-Aufnahme der Zellen mikroskopisch dokumentiert. (B) An Tag 21 werden die Zellen fixiert und die Lipidvakuolen mit Oil Red O rot angefärbt. Maßstabbalken 200 μ m. Die Aufnahmen wurden von Frau Dr. Nadine Wilhelm angefertigt.

Abb. 18 A zeigt den Verlauf der Differenzierung unter den verschiedenen Bedingungen an Tag 0, 9, 15 und 21. Die DMSO-Kontrolle unterscheidet sich nicht von der in Abb. 13

dargestellten Differenzierung unter Standardbedingungen, woraus man schließen kann, dass die verwendete Menge an DMSO nicht toxisch für die Zellen ist. An Tag 9 zeigt die Kontrolle bereits eine deutliche Ansammlung von lipidgefüllten Zellen, die an ihrer helleren Erscheinung erkennbar sind. Die beiden inhibierten Kulturen hingegen weisen nur sehr wenige helle Zellen auf. Bei den mit Q behandelten Zellen ändert sich daran auch im weiteren Verlauf der Differenzierung nichts, was dafür spricht, dass die Zellen nicht differenzieren. Die mit CX-4945 behandelte Kultur hingegen zeigt ab Tag 15 eine deutliche Zunahme an Zellen mit adipogenem Phänotyp, sodass sich der Differenzierungsstatus an Tag 21 nur unwesentlich von der Kontrolle unterscheidet. Die Färbung der Fetttröpfchen mit Oil Red O in Abb. 18 B bestätigt, dass es sich bei den mit CX-4945 behandelten Zellen tatsächlich um Adipozyten handelt. Es scheinen mehr Lipidvakuolen zu entstehen, die jedoch einen kleineren Umfang besitzen. Bereits im ungefärbten Zustand ist gut zu erkennen, dass die Zellen, die mit 30 μ M Q behandelt wurden, in deutlich geringerem Maße differenziert sind.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Hemmung mit Q die Differenzierung verhindert, wohingegen die Hemmung mit CX-4945 den Start der Differenzierung verzögert, diese Verzögerung jedoch durch eine beschleunigte Differenzierung ausgeglichen wird. Offensichtlich reagieren die hMSC unterschiedlich auf die beiden Inhibitoren. Nicht jeder Hemmstoff scheint also für jeden Zelltyp gleich gut geeignet zu sein.

6.2.4.2 Bestimmung der Zellvitalität und CK2-Aktivität

Nun stellt sich die Frage, warum die beiden Hemmstoffe unterschiedliche Effekte zeigen. Bei Induktion der Differenzierung werden viele Signalwege angeschaltet, die in proliferierenden Zellen inaktiv sind. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass differenzierende Zellen anders auf die Hemmung der CK2 mit Q und CX-4945 reagieren als proliferierende. Es soll deshalb überprüft werden, wie es sich mit der Lebensfähigkeit und der CK2-Aktivität in differenzierenden Zellen nach Hemmung verhält. Dazu wird in konfluenten hMSC die Differenzierung mit DMSO-, Q- oder CX-4945-haltigem Differenzierungsmix induziert. Nach 24, 48 und 72 h wird die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay und die CK2-Aktivität im Gesamtzellextrakt mittels *in vitro*-CK2-Kinaseaktivitäts-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

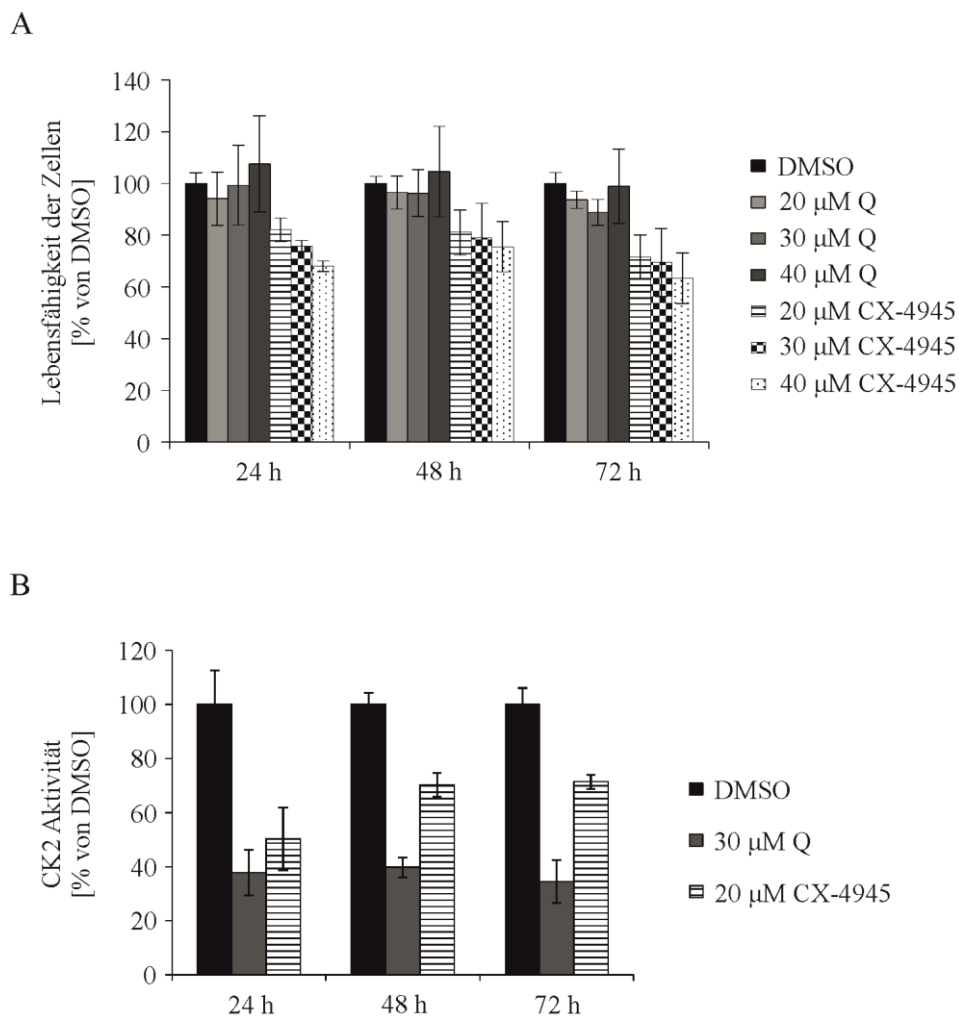


Abbildung 19: Bestimmung der Lebensfähigkeit und CK2-Aktivität in differenzierenden hMSC nach Hemmung mit Quinalizarin (Q) und CX-4945. (A) Die hMSC werden in einer Dichte von 15000 Zellen / cm² in 24 Loch-Kulturschalen ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung mit DMSO, 20-40 μM Q oder 20-40 μM CX-4945 im Differenzierungsmix induziert. Vierundzwanzig, 48 und 72 h nach Differenzierungsbeginn wird die Lebensfähigkeit mittels MTT-Assay überprüft. Dargestellt ist die prozentuale Umsetzung an Farbstoff bezogen auf DMSO (100%). Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Die hMSC werden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät (15000 Zellen /cm²) und im konfluenten Zustand mit DMSO, 30 μM Q oder 20 μM CX-4945 im Differenzierungsmix differenziert. 24, 48 und 72 h nach Differenzierungsbeginn werden die Zellen geerntet. Es werden Gesamtzellextrakte hergestellt und von gleichen Proteinmengen wird mittels *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay die CK2-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale CK2-Aktivität bezogen auf DMSO (100%).

Die in Abb. 19 A dargestellte Vitalität der Zellen zeigt, dass auch differenzierende hMSC verglichen mit DMSO unempfindlich gegenüber Q sind, da die Lebensfähigkeit zu jedem Zeitpunkt und mit jeder eingesetzten Konzentration über 90% liegt. Die Behandlung mit CX-4945 reduziert die Vitalität dosisabhängig auf minimal 72% (20 μM), 70% (30 μM) und 63%

(40 μM) nach 72 h Inkubation. Verglichen mit den in Abb. 15 A dargestellten Werten der proliferierenden Zellen (50%, 39%; 35%) reduziert sich somit der Effekt von CX-4945 auf die Lebensfähigkeit in differenzierenden Zellen, d.h. sie werden unempfindlicher. Betrachtet man die Hemmeffizienz von 30 μM Q (Abb. 17 B), lässt sich feststellen, dass sie in differenzierenden hMSC vergleichbar mit der in proliferierenden (Abb. 15 B) ist und über die Dauer von 72 h konstant bei rund 40% Restaktivität bleibt. CX-4945 hingegen, das in proliferierenden hMSC die Aktivität in einer Konzentration von 20 μM sehr stark um rund 90% gesenkt hatte, erreicht in differenzierenden Zellen nach 24 h nur eine Hemmung auf 50% Restaktivität. Nach 48 und 72 h verliert CX-4945 sogar noch weiter an Effizienz und die Restaktivität erhöht sich auf 70 und 71%.

In differenzierenden hMSC ist Q also ein effizienter Hemmstoff, der die Lebensfähigkeit der Zellen nicht einschränkt, aber dennoch die Differenzierung zu Adipozyten inhibiert. CX-4945 hingegen verliert seine Hemmeffizienz, was zu einer, im Vergleich zu proliferierenden Zellen, erhöhten Zellvitalität und zur Differenzierung zu Adipozyten führt.

6.2.4.3 Nachweis von PPAR γ 2 in der Immunfluoreszenz

Im Modellsystem der Adipogenese, den 3T3-L1 Zellen, stellt der nukleäre Hormonrezeptor PPAR γ 2 das wichtigste Schlüsselprotein der terminalen Adipozytendifferenzierung dar [35, 36]. Auch in mesenchymalen Stammzellen wird PPAR γ 2 während der Differenzierung in steigendem Maß transkribiert [146] und exprimiert [147]. Bei 3T3-L1 Zellen führt eine Hemmung der CK2 zum Ausbleiben der PPAR γ 2-Expression (siehe 6.3.3.4, [148]). Zur Überprüfung, ob die Expression des PPAR γ 2 in hMSC nach Hemmung ebenfalls verändert ist, werden die Zellen in Nunc[®] Lab-Tek[®] 8-Loch Permanox[®]-Slides ausgesät und bis zu Tag 9 in DMSO-, 20 μM CX-4945- oder 30 μM Q-haltigem Differenzierungsmix differenziert. Dieser Zeitpunkt wird gewählt, da Änderungen in der Expression bis zu diesem Zeitpunkt bereits sichtbar sein müssten. An Tag 0, 1, 2, 3, 6 und 9 werden die Zellen auf je einem "Slide" fixiert. PPAR γ 2 wird mit einem spezifischen Antikörper detektiert und durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Das Markerprotein Perilipin wird in einem parallelen Ansatz nachgewiesen und dient als Kontrolle der begonnenen Differenzierung. Abb. 20 zeigt repräsentative Aufnahmen der Ergebnisse.

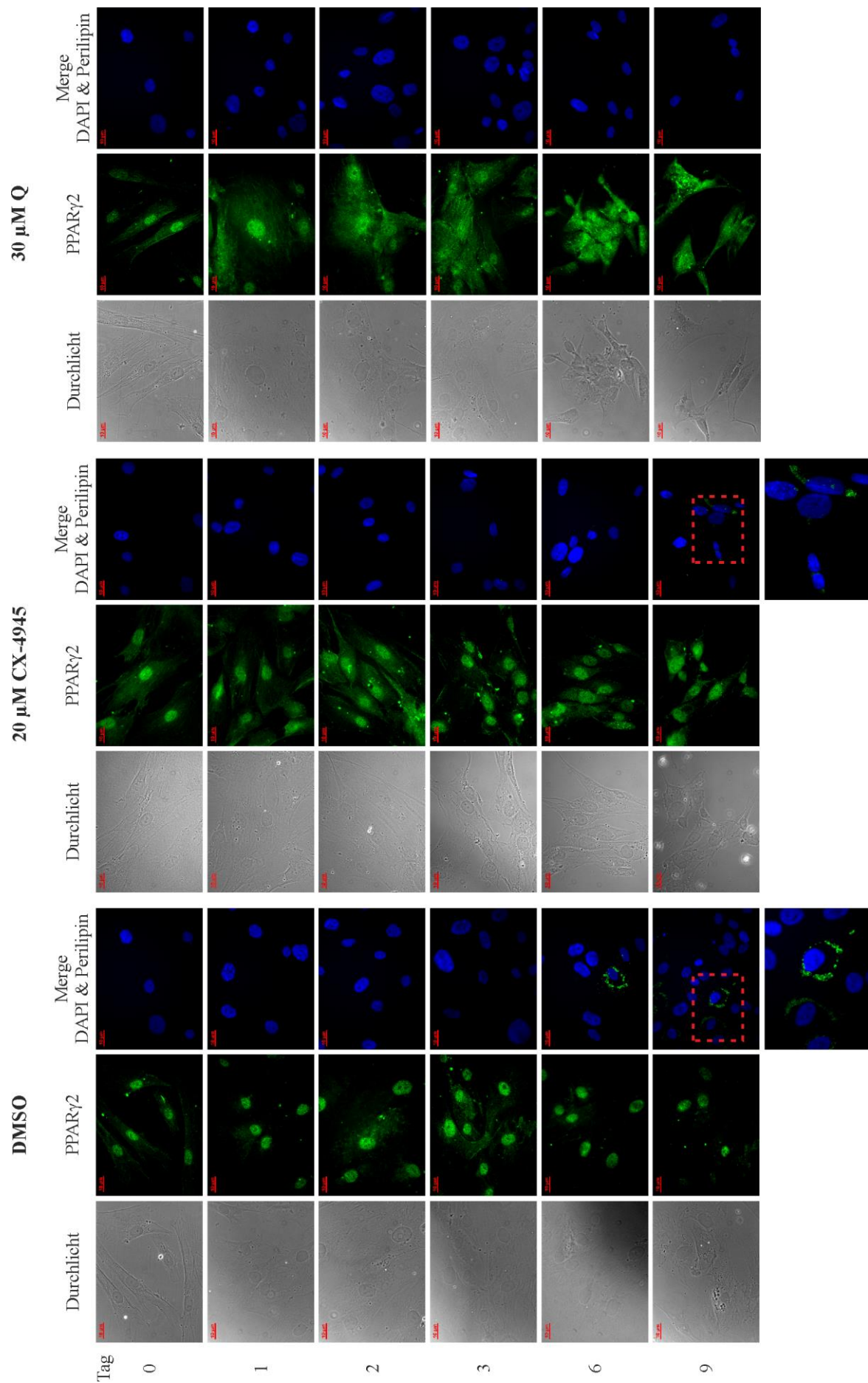


Abbildung 20: Expression von PPAR γ 2 und des Differenzierungsmarkers Perilipin in hMSC nach Hemmung der CK2 mit CX-4945 und Quinalizarin (Q). Die hMSC werden in Nunc[®] Lab-Tek[®] 8-Loch Permanox[®]-Slides ausgesät (12000 Zellen / Loch). Bei Erreichen der Konfluenz werden die Zellen auf einem "Slide" fixiert (Tag 0) und in den restlichen Zellen die Differenzierung in Gegenwart von DMSO, 20 μ M CX-4945 oder 30 μ M Q induziert. Die Zellen auf weiteren "Slides" werden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert, permeabilisiert und mit den Primärantikörpern ab45036 gegen PPAR γ 2 und #3470 gegen Perilipin über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper wird das Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugat verwendet. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Die dargestellte Verteilung von PPAR γ 2 und Perilipin wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Gesamtvergrößerung: 400x (Öl), Maßstabsbalken 10 μ m.

Eine PPAR γ 2-Expression ist von Tag 0 an nachzuweisen. Die räumliche Verteilung ist größtenteils nukleär mit wenig Protein im Cytoplasma. Diese Verteilung bleibt bei der DMSO-Kontrolle und bei 20 μ M CX-4945 auch während der Differenzierung bis Tag 9 erhalten, wobei bei den mit CX-4945 behandelten Zellen im Vergleich zu DMSO etwas mehr PPAR γ 2 im Cytoplasma vorhanden ist. Bei den mit 30 μ M Q behandelte Zellen ergibt sich ein anderes Bild. Die anfängliche Verteilung löst sich ab Tag 2 deutlich auf. Es findet eine Translokation des PPAR γ 2 aus dem Kern ins Cytoplasma statt, sodass man eine Verteilung über die komplette Zelle erhält. Durch die dadurch stark verringerte Menge an PPAR γ 2 im Kern wird die Expression der Adipozyten-spezifischen Gene verhindert, was zum Ausbleiben der Differenzierung führt. Die Expression von Perilipin ist in der DMSO-Kontrolle ab Tag 6 und in den mit CX-4945 behandelten Zellen ab Tag 9 zu erkennen. Dies passt zu der zuvor beobachteten Verzögerung der Differenzierung bei Hemmung mit CX-4945 (Abb. 18 A). Wie erwartet bleibt die Expression von Perilipin bei Hemmung mit 30 μ M Q aufgrund der nicht stattfindenden Differenzierung ebenfalls aus.

Auch wenn die Hemmung der CK2 in hMSC und 3T3-L1 einen gleichermaßen negativen Effekt auf die adipogene Differenzierung besitzt, wirkt sie auf unterschiedlichem Weg. In den 3T3-L1 Zellen fehlt die Expression des Masterregulators PPAR γ 2, wohingegen in hMSC die Expression erfolgt, jedoch eine fehlerhafte subzelluläre Lokalisation die Differenzierung verhindert, d. h. gleiches Ergebnis, unterschiedliche Ursache. In Bezug auf weitere Untersuchungen muss die Wahl des verwendeten Inhibitors sorgfältig evaluiert werden, da nicht alle Inhibitoren für alle Zellsysteme geeignet sind, wie man hier beispielhaft an CX-4945 sieht.

6.3 CK2 und Adipogenese - Ergebnisse in der Zelllinie 3T3-L1

Die murine Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 ist ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung der Adipogenese. Fast jeder Schritt der adipogenen Signalkaskade wurde ursprünglich in ihnen entdeckt oder bewiesen [149]. Das primäre Zellsystem der hMSC ist zwar näher am Menschen, aber auch nur begrenzt ergiebig, da sie empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen sind, ihre Handhabung schwieriger und ihre Nutzbarkeit aufgrund der begrenzten Zellzahl und Proliferationskapazität geringer ist. Für Untersuchungen zu Interaktionen von Proteinen, bei denen man viel Zellmaterial benötigt oder für Untersuchungen, bei denen man Plasmide über Transfektion einbringen muss, sind sie nur schlecht geeignet. Aus diesen Gründen wird die Rolle der CK2 im Hinblick auf die adipogenen Signalwege im weiteren Verlauf dieser Arbeit an den 3T3-L1 Zellen untersucht. Unterstützend dazu werden Untersuchungen mit Phosphorylierungsmutanten des CK2-Substrats C/EBP δ in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 durchgeführt, da diese sehr wenig endogenes C/EBP δ enthält, was gegebenenfalls die Ergebnisse verfälschen würde.

6.3.1 Vorstellung des Differenzierungssystems

Das Differenzierungssystem der 3T3-L1 unterscheidet sich nur unwesentlich von dem der hMSC (vgl. Abb. 12, Abb. 21).

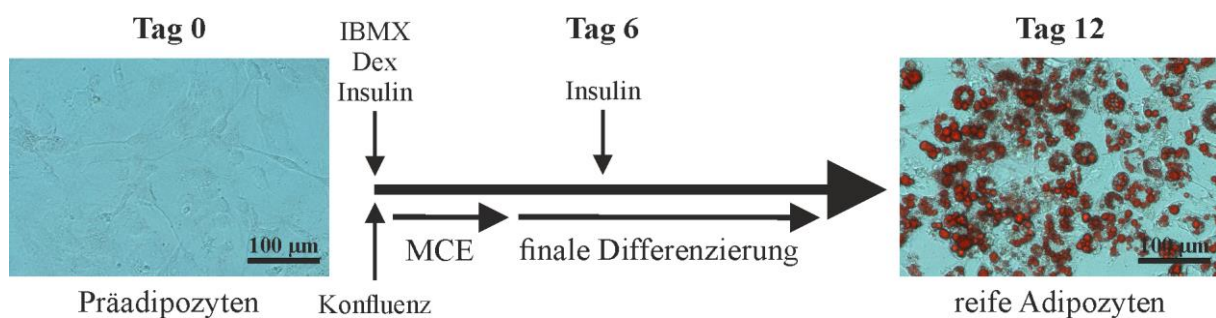


Abbildung 21: Schema der Differenzierung von Präadipozyten (3T3-L1 Zellen) zu Adipozyten. Bei Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wird die adipogene Differenzierung durch Zugabe von IBMX, Dexamethason (Dex) und Insulin induziert (Differenzierungsmix I). Ab Tag 6 erhalten die Zellen nur noch Insulin (Differenzierungsmix II). Über eine Differenzierungsdauer von 12 Tagen erfolgt zunächst die mitotische klonale Expansion (MCE) und anschließend die finale Differenzierung zu reifen Adipozyten. Die Lipidtröpfchen der Adipozyten sind mit Oil Red O angefärbt. Maßstabbalken 100 µm.

Bei Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wird die Differenzierung durch Mediumwechsel zum Differenzierungsmix I induziert. Dieser enthält IBMX, Dexamethason und Insulin. Ab Tag 6

erhalten die Zellen Differenzierungsmix II, der nur noch Insulin enthält. Alle 2-3 Tage wird das Medium erneuert. Zu Beginn der Differenzierung durchlaufen die Zellen die MCE, die bei den 3T3-L1 essentiell ist [29]. Im Anschluss daran erfolgt die terminale Differenzierung mit Ausbildung des Phänotyps des reifen Adipozyten. Der gesamte Prozess ist an Tag 12 abgeschlossen. In 3T3-L1 Zellen lässt sich dabei ebenfalls eine morphologische Veränderung der Zellen feststellen. Das fibroblastoide Aussehen der Präadipozyten wird zum abgerundeten mit mehreren Lipidvakuolen gefüllten Phänotyp des Adipozyten. Die Lipidtröpfchen können ebenfalls mit Oil Red O angefärbt werden.

6.3.2 Untersuchungen zur CK2 während der Differenzierung

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde die Expression und Aktivität der CK2 während der Differenzierung bereits von Frau Dr. Nadine Wilhelm und Frau Dr. Katja Kostelnik untersucht. Sie fanden heraus, dass die Expression aller CK2 Untereinheiten zu Beginn der Differenzierung bis Tag 4 ansteigt und danach kontinuierlich bis Tag 12 abnimmt und zwar deutlich unter die Expression an Tag 0. Diese Beobachtung legt nahe, dass die CK2 zu Beginn der Differenzierung eine Rolle spielen könnte und für den späteren Verlauf entweder nicht mehr gebraucht und abgebaut werden kann oder vielleicht sogar aktiv abgebaut werden muss. Die Aktivität spiegelt die Zu- und Abnahme der CK2-Menge wider, was eine Expressions-unabhängige Regulation der Aktivität unwahrscheinlich macht [113]. Bei den hMSC konnte der anfängliche Anstieg der CK2-Aktivität nicht beobachtet werden. Die Aktivität nimmt zusammen mit der CK2 α -Expression von Beginn der Differenzierung an kontinuierlich ab. Auch hier scheint es also Zelltyp-spezifische Unterschiede zu geben.

6.3.2.1 Die mRNA Expression der CK2

Zur Überprüfung, ob die Änderung der Proteinmenge während der Differenzierung durch eine Änderung der Transkription der CK2-Gene hervorgerufen wird, werden die mRNA-Spiegel der CK2-Untereinheiten α und β während der Differenzierung untersucht werden. Dazu wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung die Gesamt-RNA aus 3T3-L1 Zellen isoliert und daraus die mRNA-Menge von CK2 α und β mittels quantitativer Reverse Transkriptase (qRT) *real time* PCR mit CK2-spezifischen Primern, wie in 5.2.5 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Form eines Balkendiagramms bezogen auf den mRNA-Gehalt an Tag 0 in Abb. 22 dargestellt.

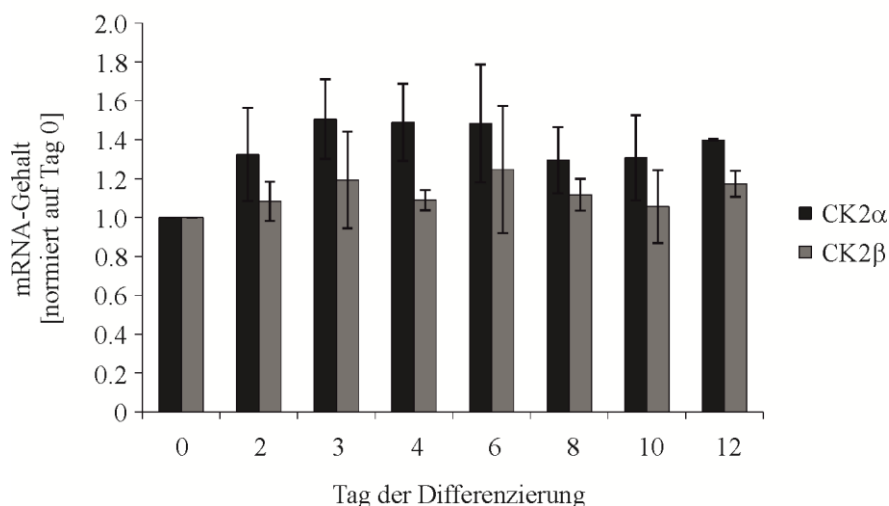


Abbildung 22: Analyse des mRNA-Gehalts von CK2 α und β während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Die 3T3-L1 Zellen werden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. An Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen mit Hilfe des peqGOLD TriFast™ Reagenz geerntet. Die Gesamt-RNA wird isoliert und daraus mittels qRT *real time* PCR mit spezifischen Primern die mRNA-Menge von CK2 α und β bestimmt. Die 18S rRNA dient als interne Kontrolle und die für die CK2 erhaltenen Werte werden darauf normiert. Die Ergebnisse der Analyse sind als Balkendiagramm auf Tag 0 bezogen dargestellt. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die mRNA-Menge von CK2 α steigt bis Tag 3 auf einen Wert von etwa 1.5 an, hält diesen bis Tag 6 und fällt anschließend wieder etwas ab, wobei ein 1.3-faches der ursprünglichen Menge nicht unterschritten wird. Die CK2 β Menge schwankt während der Differenzierung, wobei der mRNA-Gehalt nicht höher als 1.25 ansteigt, alle Mengen jedoch über dem von Tag 0 liegen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der anfängliche Anstieg der Proteinexpression zumindest im Fall von CK2 α auf eine verstärkte Transkription des Gens zurückgeführt werden kann. Der Abfall der Proteinexpression ab Tag 6 korreliert jedoch nicht mit der mRNA-Menge, was für einen gezielten Abbau der CK2-Untereinheiten oder eine reduzierte Translationsrate spricht.

6.3.2.2 Die subzelluläre Lokalisation der CK2

Bei den hMSC hat sich gezeigt, dass die CK2 Untereinheiten, speziell CK2 β , während der Differenzierung zwischen Cytoplasma und Kern wandern (Abb. 16). Dies stellt unabhängig von der Menge an Protein einen weiteren Regulationsmechanismus dar, da viele Substrate der CK2 vom Holoenzym phosphoryliert werden und die Untereinheiten, um dieses ausbilden zu

können, im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sein müssen. Zur Überprüfung einer möglichen Änderung der subzellulären Lokalisation wird die Verteilung von CK2 α und CK2 β während der 3T3-L1 Differenzierung mittels Immunfluoreszenz untersucht.

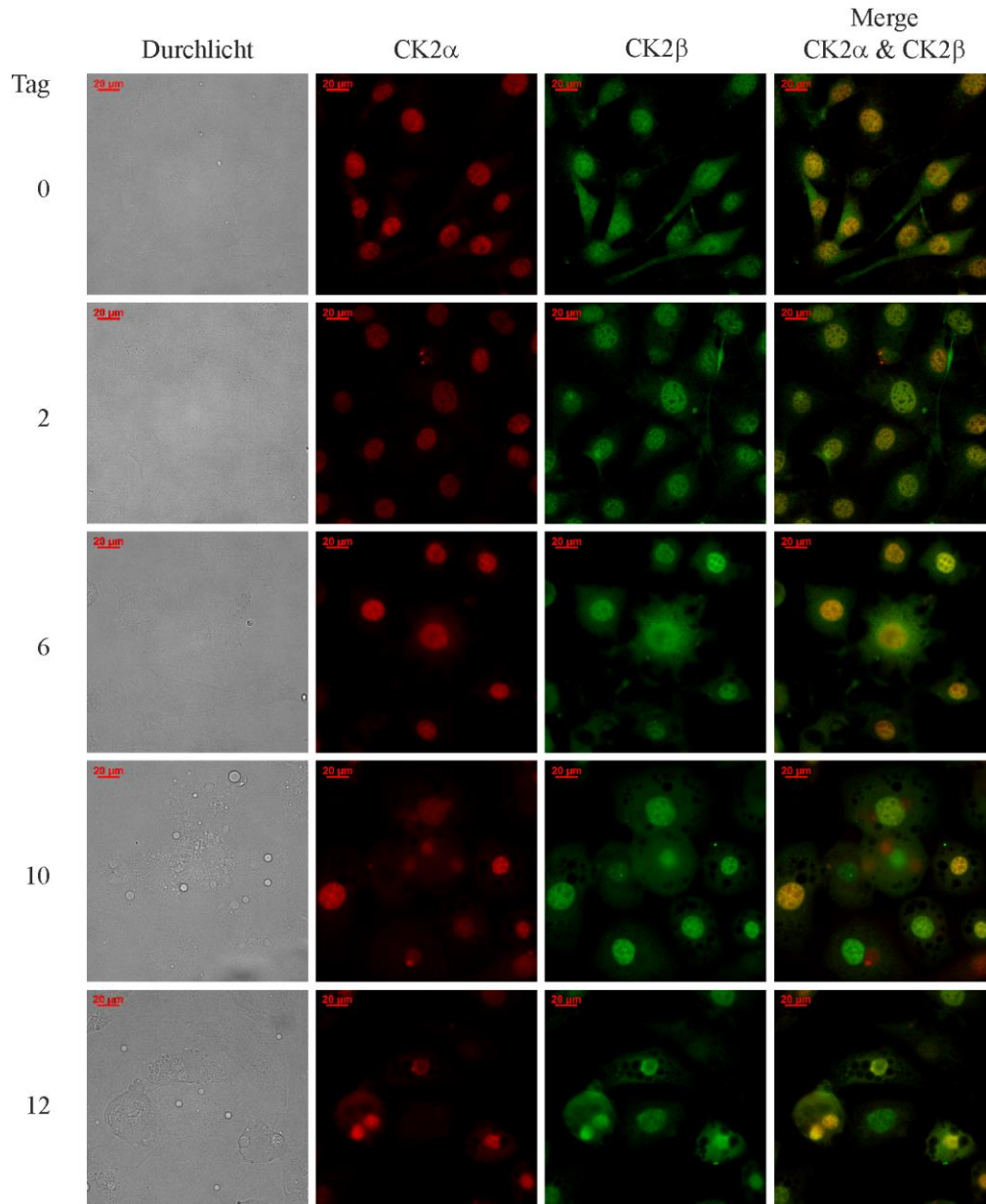


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation der CK2 im Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.

3T3-L1 Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung durch Zugabe von Differenzierungsmix I induziert. Jeweils an Tag 0, 2, 6, 10 und 12 werden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Die Zellen werden permeabilisiert und mit den Primärantikörpern 1A5 gegen CK2 α und Serum #32 gegen CK2 β über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper werden die Alexa Fluor 546 Ziege-Anti-Maus- und Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugate verwendet. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Die dargestellte Verteilung der CK2-Untereinheiten wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Gesamtvergrößerung: 400x (Öl), Maßstabsbalken 20 μ m.

Die in Abb. 23 dargestellte subzelluläre Verteilung von CK2 α und β lässt kein ausgeprägtes "shuttling" der CK2 Untereinheiten während der Differenzierung erkennen. CK2 α ist hauptsächlich im Kern lokalisiert und nur wenig im Cytoplasma. Ab Tag 10 lässt sich eine ungleichmäßige Verteilung beobachten, was sich darin äußert, dass manche Zellen im Vergleich zu anderen kaum noch CK2 α enthalten. Eine Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zelle lässt sich jedoch nicht ableiten. Von CK2 β findet man im Vergleich zu CK2 α mehr im Cytoplasma, wobei auch bei CK2 β die nukleäre Lokalisation überwiegt. Die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzen (Merge) bestätigt, dass beide Untereinheiten hauptsächlich im Kern kolokalisiert sind, was sich an einer gelb-orangen Färbung erkennen lässt. Die Zellen, die an Tag 10 bzw. 12 kaum noch CK2 α enthalten, zeigen dagegen nur die grüne CK2 β Fluoreszenz.

Der Vergleich mit den in den hMSC erhaltenen Ergebnissen der Immunfluoreszenz (6.3.2.2) zeigt, dass es nicht nur in der CK2-Expression und -Aktivität, sondern auch in der subzellulären Lokalisation der CK2-Untereinheiten Unterschiede zwischen den Zellsystemen gibt. In den hMSC finden sehr viel stärkere Verschiebungen zwischen den Zellkompartimenten Cytoplasma und Zellkern statt, was bedeuten könnte, dass die Funktionen der CK2 in den Zellen teilweise unterschiedlich sein könnten.

6.3.2.3 Die Expression der CK2 in Cytoplasma- und Zellkern-Extrakten

Da bei der Immunfluoreszenz nur einzelne Ausschnitte analysiert werden können, wird nun die Verteilung der CK2 in Cytoplasma- und Zellkernextrakten einer kompletten Zellpopulation untersucht, um so ein Gesamtbild zu erhalten. Dazu werden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz differenziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten werden die Zellen geerntet und daraus Cytoplasma- und Zellkernextrakte hergestellt. Gleiche Mengen an Protein werden auf 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der CK2-Untereinheiten CK2 α und CK2 β erfolgt mit spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrollen dienen GAPDH für die cytoplasmatischen Proteine und das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) für die Zellkernproteine.

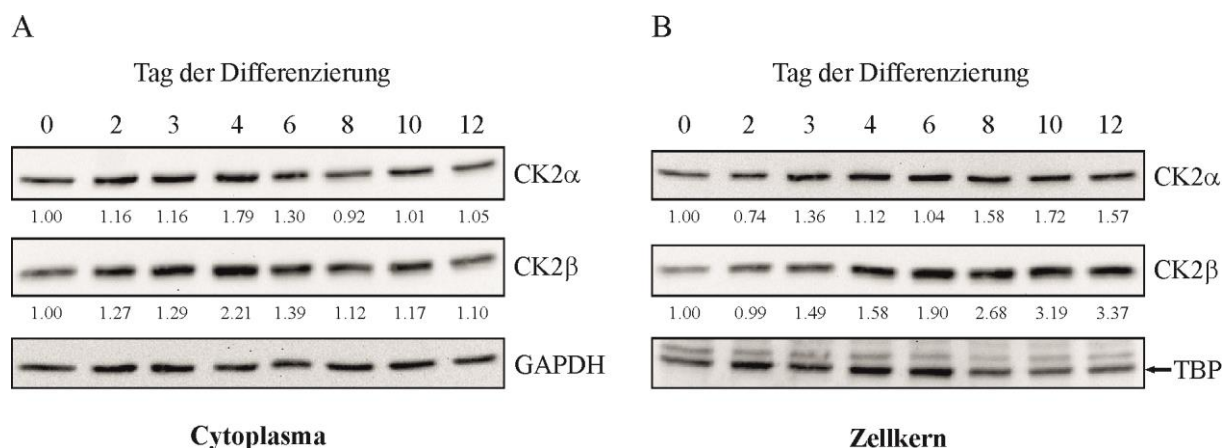


Abbildung 24: Expression von CK2α und CK2β in Cytoplasma und Zellkern während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Die 3T3-L1 Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. An Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen je einer Kulturschale geerntet. Es werden Cytoplasma- und Zellkernextrakte hergestellt und je 30 µg Protein auf einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran werden die CK2-Untereinheiten mit den spezifischen Antikörpern 1A5 und sc-46666 markiert und mithilfe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. GAPDH dient als Ladekontrolle der Cytoplasma-Proteine und wird mit sc-25778 nachgewiesen (A). TBP dient als Ladekontrolle der Zellkern-Proteine und wird mit sc-273 nachgewiesen (B). Die Expressionsstärke von CK2α und β wird mit der Software Quantity One 4.6.5 auf GAPDH bzw. TBP bezogen quantifiziert. Die Intensität an Tag 0 wird als Referenz gewählt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen bestätigte, dass sie keine Proteine der jeweils anderen Fraktion enthalten (nicht gezeigt).

Die in Abb. 24 dargestellte Analyse der Verteilung der CK2-Untereinheiten in Cytoplasma- und Zellkernextrakten zeigt, dass sich, obwohl in der Immunfluoreszenz kein "shuttling" zu erkennen ist, die Proteinmenge in den beiden Kompartimenten während der Differenzierung sehr wohl verändert. Die Menge beider Untereinheiten nimmt im Cytoplasma bis Tag 4 deutlich zu und fällt anschließend wieder etwa auf den Ausgangswert an Tag 0 zurück. Die Menge an CK2α im Zellkern schwankt zu Beginn der Differenzierung und nimmt dann ab Tag 8 deutlicher zu, wohingegen die Menge an CK2β bereits von Tag 3 an kontinuierlich und stark zunimmt.

Diese Ergebnisse weichen zum Teil von den im Gesamtzellextrakt erhaltenen Expressionsmustern ab. Der anfängliche Anstieg der Expression stimmt zwar überein, jedoch bleibt der darauf folgende starke Abfall aus. Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen Extraktionsmethoden darstellen. Obwohl im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Analyse hier Unterschiede in der subzellulären Verteilung zu beobachten sind, passen auch diese

Ergebnisse nicht zu den mittels Immunfluoreszenz beobachteten Mustern der CK2 Untereinheiten in den hMSC. Dies unterstützt die zuvor getroffene Vermutung, dass die CK2 unterschiedliche Funktionen in den beiden Zelltypen haben könnte.

6.3.3 Untersuchungen zur Auswirkung der CK2-Hemmung auf die Differenzierung

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 mit DMAT oder Quinalizarin die Adipogenese in 3T3-L1 Zellen verhindert [113]. Da DMAT aufgrund seiner Unspezifität und "Off-target"-Effekte heute nicht mehr als CK2-Inhibitor verwendet wird, wird hier neben Quinalizarin, wie in den hMSC, CX-4945 als zweiter Inhibitor eingesetzt.

6.3.3.1 Bestimmung und Überprüfung der Inhibitorkonzentration

Da CX-4945 in den 3T3-L1 noch nicht verwendet wurde, muss, wie bei den hMSC, zunächst ausgetestet werden in welcher Konzentration er eingesetzt werden muss, um die gewünschte Hemmung zu erreichen. Zusätzlich dazu soll die Effizienz des bekannten Inhibitors Quinalizarin, für das von Frau Dr. Kostelnik eine Konzentration von 30 μM ermittelt wurde, überprüft werden. Die Zellen werden für 24 und 72 h in Anwesenheit von DMSO, 30 μM Q oder 5-20 μM CX-4945 differenziert, geerntet und die CK2-Aktivität aus Gesamtzellextrakt mittels *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay bestimmt. Im Anschluss wird für Q und die gewählte Konzentration an CX-4945 die Hemmung der Differenzierung überprüft, indem die Lipidvakuolen an Tag 12 mit Oil Red O angefärbt werden.

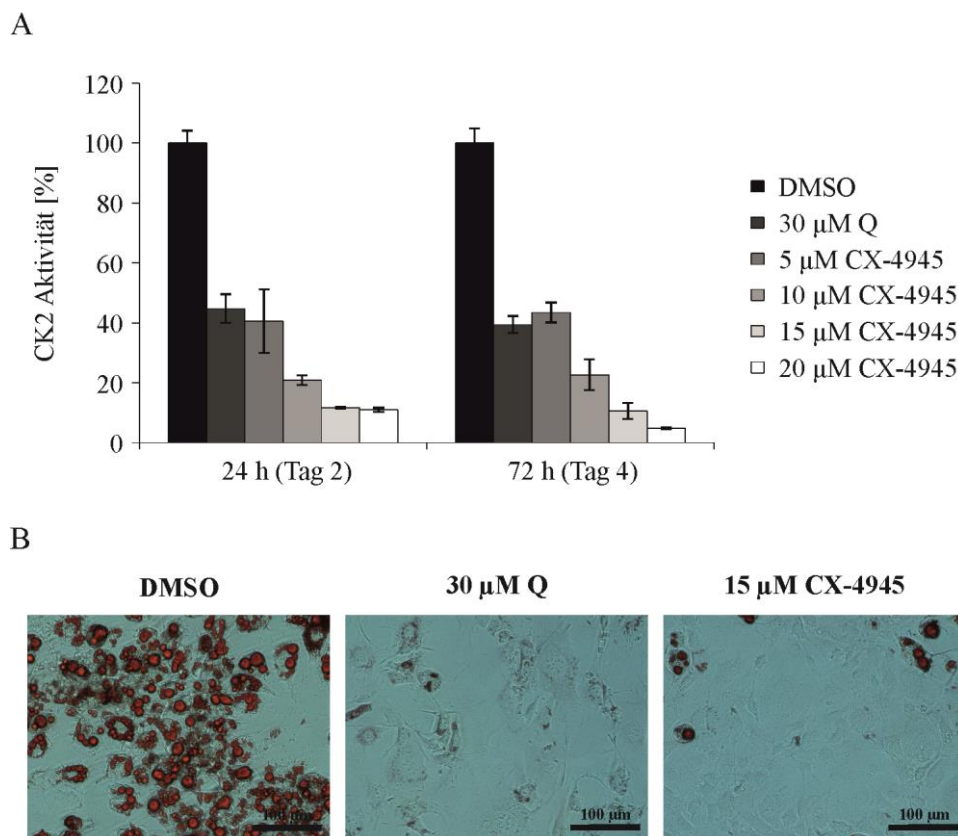


Abbildung 25: CK2-Aktivität in differenzierenden 3T3-L1 Zellen nach Hemmung mit Quinalizarin (Q) und CX-4945 und Analyse des Differenzierungsstatus. In 3T3-L1 Zellen wird bei Erreichen der Konfluenz die Differenzierung induziert. (A) Dem Differenzierungsmix wird DMSO, 30 µM Q, 5, 10, 15 oder 20 µM CX-4945 zugesetzt. Nach 24 und 72 h Inkubation werden die Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Gleiche Proteinmengen werden mittels *in vitro*-CK2 Kinaseaktivitäts-Assay auf ihre CK2-Aktivität untersucht. Die gemessenen Werte werden auf DMSO (100%) normiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Dem Differenzierungsmix wird DMSO, 30 µM Q oder 15 µM CX-4945 zugesetzt. An Tag 12 werden die Lipidtröpfchen mit Oil Red O angefärbt und es erfolgt die mikroskopische Dokumentation des Differenzierungsstatus. Gesamtvergrößerung: 200x, Maßstab Balken 100 µm.

Die Aktivität der CK2 lässt sich, wie erwartet, durch 30 µM Q inhibieren (Abb. 25 A). Die Hemmung beträgt nach 24 h knapp 60% und lässt sich bis 72 h aufrechterhalten. Auch CX-4945 ist in der Lage die Kinaseaktivität der CK2 zu reduzieren. Die Reduktion ist dosisabhängig, wobei eine Konzentration von 5 µM mit der Hemmeffizienz von Q vergleichbar ist und bei der höchsten Konzentration von 20 µM die Restaktivität der CK2 unter 10% beträgt. Auch CX-4945 ist über einen Zeitraum von 72 h effektiv. Abb. 25 B zeigt den Differenzierungsstatus der 3T3-L1 Zellen an Tag 12 der Differenzierung nach kontinuierlicher Behandlung mit DMSO, 30 µM Q oder 15 µM CX-4945. Anhand der durch Oil Red O deutlich sichtbaren Lipidvakuolen lässt sich erkennen, dass nach Hemmung der

CK2 kaum Adipozyten ausgebildet wurden. Der Großteil der Zellen besitzt die fibroblasten-förmige Morphologie der Präadipozyten, wohingegen in der DMSO-Kontrolle nahezu alle Zellen zu Adipozyten differenziert sind. Eine Schädigung der Zellen durch die Inhibitoren ist nicht zu erkennen.

Für die weiteren Untersuchungen wird CX-4945 in der Konzentration 15 μM eingesetzt, da sowohl die Hemmung der CK2 als auch die Hemmung der Adipogenese mit dieser Konzentration von CX-4945 sehr gut ist.

6.3.3.2 Eingrenzung des CK2-Zeitfensters

Im Zusammenhang mit der Hemmung mit DMAT oder Quinalizarin wurde beobachtet, dass eine Hemmung der CK2 ab Tag 6 keinen Einfluss mehr auf die Differenzierung besitzt [113]. Ab Tag 6 scheint die Aktivität der CK2 für die erfolgreiche Differenzierung folglich nicht mehr wichtig zu sein, was mit ihrer reduzierten Expression und Aktivität übereinstimmt. Nun soll der Zeitraum, an dem die CK2 eine Rolle spielt, näher eingegrenzt werden, indem die Zugabe der Inhibitoren zu steigenden Zeitpunkten während der Differenzierung erfolgt. An Tag 12 wird der Differenzierungsstatus durch Oil Red O Färbung überprüft. Durch Elution des Farbstoffs und Messung der Absorption im Photometer kann die Menge an gebildetem Fett und somit indirekt die Anzahl der Adipozyten quantitativ bestimmt werden.

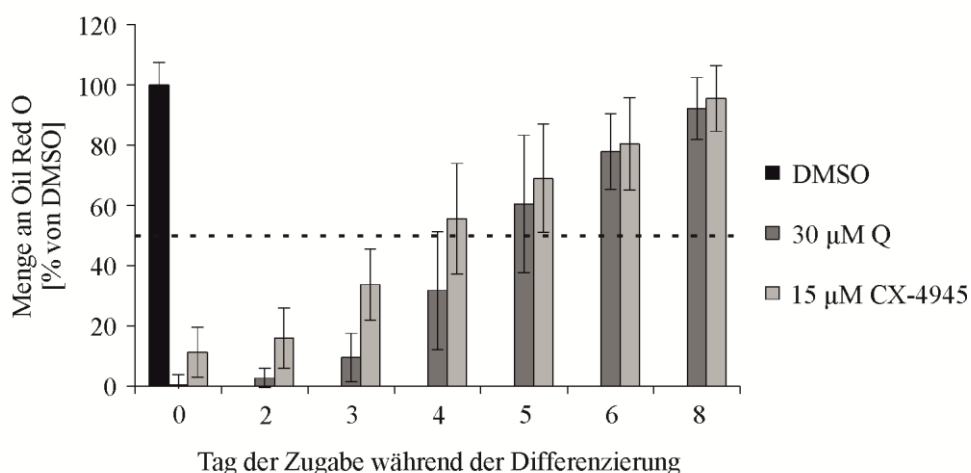


Abbildung 26: Oil Red O-Quantifizierung an Tag 12 der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen nach Hemmung der CK2 mit Quinalizarin (Q) und CX-4945 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Differenzierungsbeginn. Die 3T3-L1 Zellen werden in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung eingeleitet. Dem Differenzierungsmix wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten DMSO, 30 μM Q oder 15 μM CX-4945 bis zum Ende der Differenzierung zugesetzt. An Tag 12 werden die Lipidtröpfchen mit Oil Red O gefärbt. Durch Zugabe von 100% Isopropanol wird das Oil Red O

eluiert und die Absorption bei 515 nm im Photometer bestimmt. Die erhaltene Absorption wird auf die von DMSO normiert (100%). Die gestrichelte Linie dient als 50%-Marke. Die Standardabweichung ergibt sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Quantifizierung des Oil Red O-Gehalts (Abb. 26) bestätigt, dass die ab Tag 0 mit den Inhibitoren behandelten Zellen kaum Fett und somit kaum Oil Red O akkumuliert haben: die mit Q behandelten Zellen weisen fast kein Oil Red O auf und die mit CX-4945 behandelten etwa 10% des Gehalts der DMSO-Kontrolle. Allgemein lässt sich sagen, dass je später die Inhibitoren zugegeben werden, desto mehr Zellen differenzieren zu Adipozyten. Die mit CX-4945 behandelten Zellen zeigen bei Behandlung ab Tag 4 (72 h) einen Fettanteil von über 50% verglichen mit der DMSO-Kontrolle, die mit Q behandelten Zellen ab Tag 5.

Die CK2 scheint in 3T3-L1 Zellen somit innerhalb der ersten 72 h am wichtigsten zu sein, da bei einer Hemmung zu einem späteren Zeitpunkt schon mehr als die Hälfte der Zellen differenzieren. Auch bei den SVZ-Zellen wird die Aktivität der CK2 zu Beginn der Differenzierung benötigt und ist nach Anschub der Differenzierung entbehrlich. Da die Zellsysteme zwei unterschiedliche Differenzierungsmodelle darstellen, handelt es sich möglicherweise um ein allgemeines Prinzip.

6.3.3.3 Analyse der Proliferation während der MCE

Eines der ersten Ereignisse am Anfang der Differenzierung ist die MCE, die essentiell für die Differenzierung ist. Da die CK2 wichtig für die Proliferation von Zellen ist, stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der CK2 möglicherweise auch die Proliferation der 3T3-L1 während der MCE beeinflusst. Zur Überprüfung werden die Zellen vor Beginn der Differenzierung (Tag 0), sowie 24 h und 48 h nach Beginn gezählt und eine Wachstumskurve erstellt, die in Abb. 27 dargestellt ist.

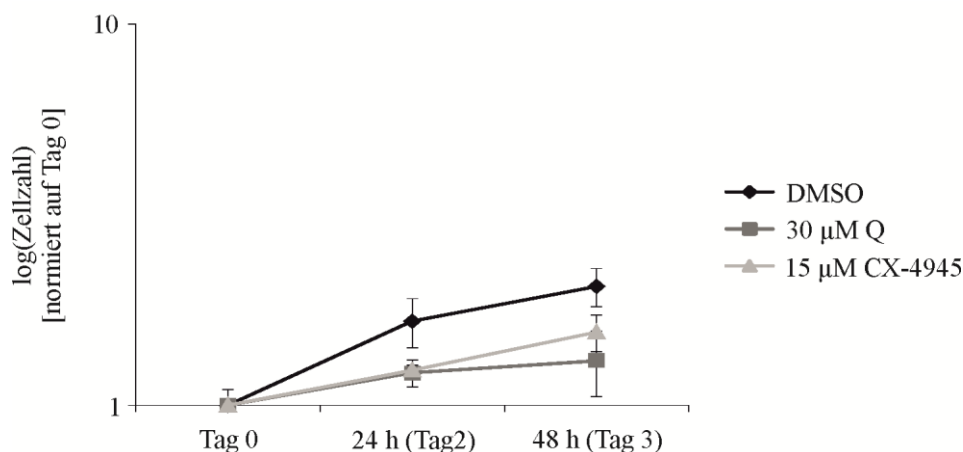


Abbildung 27: Proliferation der 3T3-L1 Zellen während der MCE bei Hemmung mit Quinalizarin (Q) und CX-4945. Die 3T3-L1 Zellen werden in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz mit DMSO-, 30 µM Q oder 15 µM CX-4945-haltigem Differenzierungsmix I behandelt. An Tag 0, 2 und 3 werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die erhaltenen Zellzahlen werden auf Tag 0 normiert und halblogarithmisch als Wachstumskurve dargestellt. Die Standardabweichung ergibt sich aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Wachstumskurve zeigt, dass sich die mit DMSO behandelten Zellen innerhalb von 48 h etwa verdoppeln. Bei einer Hemmung der CK2 proliferieren die Zellen deutlich langsamer, wobei sich bei CX-4945-Behandlung ein wenig mehr Zellen teilen als bei Q-Behandlung der Zellen.

Es ist also tatsächlich so, dass eine Hemmung der CK2 die Proliferation der Zellen verlangsamt, jedoch nicht komplett unterdrückt.

6.3.3.4 Nachweis von PPAR γ , C/EBP α und SREBP-1

Die wichtigsten Regulatorproteine für die Ausbildung des adipogenen Phänotyps sind die beiden Transkriptionsfaktoren PPAR γ 2 und C/EBP α . Bei Deletion der beiden Proteine bleibt die Differenzierung aus [36, 150]. Auch die Hemmung der CK2 mit Q während der Differenzierung unterdrückt die Expression von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 [148]. In den hMSC konnte beobachtet werden, dass es nach Hemmung der CK2 zur Expression von PPAR γ 2 kommt, dieses jedoch ins Cytoplasma transportiert wird, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht ausüben kann (siehe 6.2.4.3). Da bislang keine Ergebnisse mit dem Hemmstoff CX-4945 in 3T3-L1 vorliegen, wird die PPAR γ -Expression mit beiden Hemmstoffen überprüft und durch eine mRNA-Analyse von PPAR γ 2 ergänzt. Zusätzlich dazu werden der mRNA-Gehalt und die Expression von C/EBP α , sowie die Expression von

SREBP-1 untersucht. SREBP-1 ist für den Fettsäure- und Lipidstoffwechsel der Adipozyten unerlässlich. Es erhält seine aktive Form durch Spaltung des SREBP-1 Vollängen (VL)-Proteins (114-120 kDa) im Golgi-Apparat. Das freigesetzte N-terminale Spaltprodukt (SP, 68 kDa) wandert in den Kern und induziert dort als Transkriptionsfaktor Zielgene des Lipidstoffwechsels, wie z.B. den LDL-Rezeptor [151]. Zusätzlich dazu ist es u.a. an der Aktivierung von PPAR γ beteiligt, indem es einen endogenen Liganden erzeugt [152].

Die Analyse des mRNA-Gehalts erfolgt durch qRT *real time* PCR. Diese Analyse wird nur mit dem Hemmstoff Q durchgeführt, da mit CX-4945 das gleiche Ergebnis erwartet wird und Q eine stärkere Hemmung der Adipogenese zeigt. 3T3-L1 Zellen werden in Anwesenheit von DMSO oder 30 μ M Q differenziert und an Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 der Differenzierung mit dem peqGOLD TriFast™ Reagenz lysiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA wird die mRNA Menge von PPAR γ 2 und C/EBP α mit Hilfe von spezifischen Primern bestimmt. Zur Analyse der Proteinexpression von PPAR γ , C/EBP α und SREBP-1 wird die Differenzierung mit DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 im Differenzierungsmix induziert. An Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen geerntet und Gesamtproteinextrakte daraus hergestellt. Gleiche Proteinmengen werden in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgt mit spezifischen Primärantikörpern und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern per Chemilumineszenz.

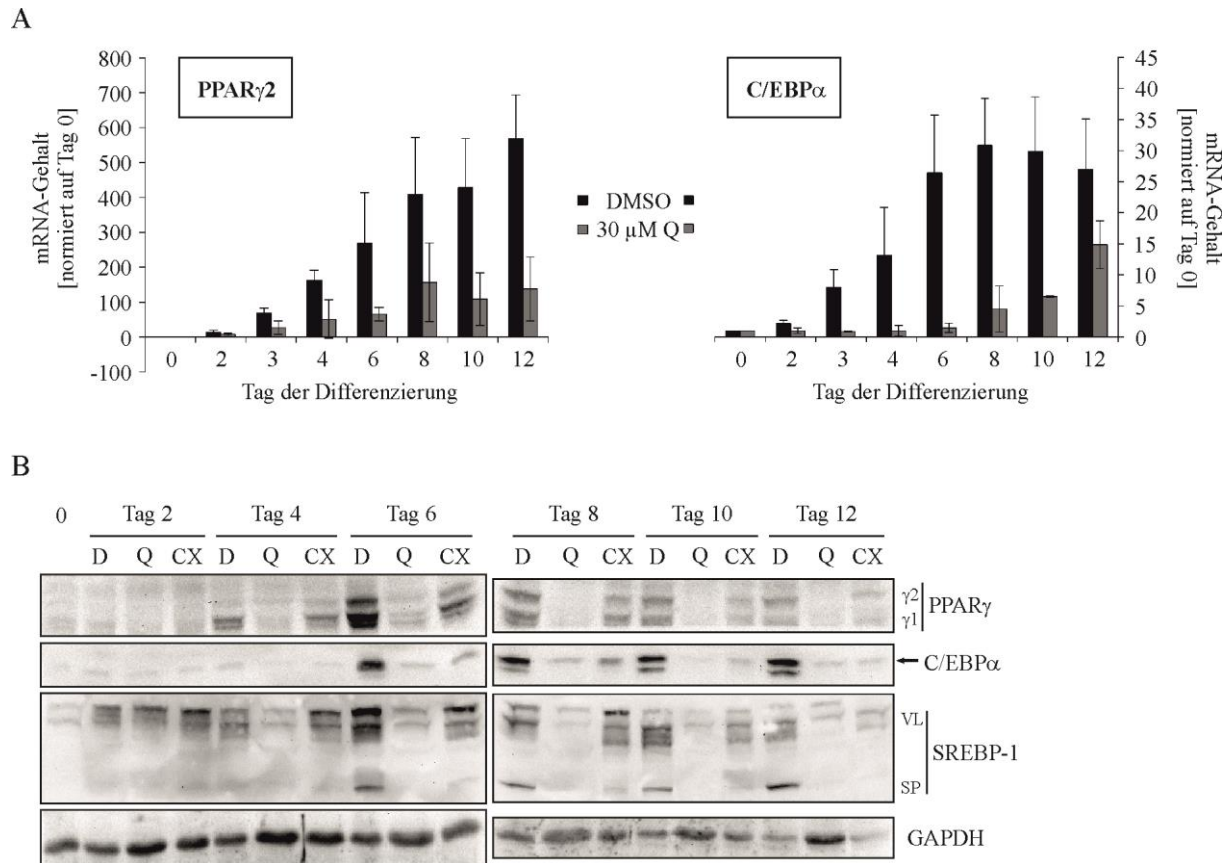


Abbildung 28: mRNA-Gehalt und Proteinexpression von PPAR γ , C/EBP α und SREBP-1 in 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung und nach CK2-Hemmung. (A) 3T3-L1 Zellen werden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz unter Zugabe von DMSO oder 30 μ M Q zum Differenzierungsmedium differenziert. An Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen einer Schale mit dem peqGOLD TriFastTM Reagenz geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Mittels qRT *real time* PCR wird mit spezifischen Primern die mRNA-Menge von PPAR γ 2 und C/EBP α bestimmt. Die 18S rRNA dient als interne Kontrolle und die erhaltenen Werte werden darauf normiert. Die Ergebnisse der Analyse sind als Balkendiagramm auf Tag 0 bezogen dargestellt. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Experimenten. (B) 3T3-L1 Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Dem Differenzierungsmix wird DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 (CX) zugegeben. An Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen geerntet und Gesamtextrakte daraus hergestellt. Je 100 μ g Protein werden in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Expression von PPAR γ , C/EBP α und SREBP-1 wird mithilfe der spezifischen Antikörper #2430, ab40764 und sc-13551 untersucht. Als Ladekontrolle dient GAPDH, das mit dem Antikörper sc-25778 nachgewiesen wird.

Abb. 28 A zeigt die mRNA-Menge von PPAR γ 2 und C/EBP α während der Differenzierung im ungehemmten (DMSO) und gehemmten (30 μ M Q) Zustand. In der DMSO-Kontrolle nimmt die mRNA-Menge beider Proteine während der Differenzierung stark zu; der mRNA-Gehalt von PPAR γ 2 steigt bis Tag 12 um das 550-fache und der von C/EBP α steigt bis Tag 8

auf das 30-fache an und bleibt dann etwa auf diesem Niveau. In den gehemmten Zellen hingegen verläuft der Anstieg deutlich abgeschwächt. Die Analyse der Proteinexpression in Abb. 28 B ergibt ein sehr ähnliches Bild. In der DMSO-Kontrolle ist PPAR γ 1 ab Tag 4 nachweisbar, die für die Adipogenese relevante Isoform PPAR γ 2, genau wie C/EBP α , ab Tag 6. Bei Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q hingegen wird kein oder nur sehr wenig PPAR γ und C/EBP α exprimiert. Bei der Hemmung mit 15 μ M CX-4945 wird ein wenig mehr PPAR γ und C/EBP α gebildet, die Expression liegt jedoch auch hier deutlich unter der bei DMSO beobachteten. Erklärbar sind diese Unterschiede durch die bei der Oil Red O-Quantifizierung in Abb. 26 beobachtete Restdifferenzierung von etwa 10% bei der Hemmung mit CX-4945. Die Proteinexpression des SREBP-1 VL-Proteins ist bereits ab Tag 2 nachweisbar, das aktive SP jedoch erst ab Tag 6. Auch bei SREBP-1 ist das SP nur in der DMSO-Kontrolle und in ganz geringem Maße bei den mit CX-4945 gehemmten Zellen erkennbar. Zudem ist in den mit Q behandelten Zellen auch die Expression des VL-Proteins ab Tag 4 stark reduziert. Zusammenfassend kann man also sagen, dass eine Hemmung der CK2 die Expression der beiden Masterregulatoren PPAR γ und C/EBP α sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stark reduziert. Durch die fehlende Expression wird die Differenzierung verhindert, was dazu führt, dass SREBP-1 zur Regulation des Lipidstoffwechsels nicht benötigt und somit auch nicht gespalten wird.

6.3.4 Charakterisierung von C/EBP δ als CK2-Substrat in HCT116 Zellen

Zur Aufklärung der Frage, warum nach Hemmung der CK2 die Expression von PPAR γ nicht mehr induziert wird, wurden von Frau Dr. Katja Kostelnik und Herrn Dr. Andreas D. Zimmer die prominenten Proteine des adipogenen Signalweges untersucht (siehe Abb. 4). Sie fanden heraus, dass bis einschließlich C/EBP β und C/EBP δ die Expression auch bei Hemmung der CK2 normal abläuft [148, 153]. Da die Transkription von PPAR γ durch C/EBP β und C/EBP δ induziert wird, muss der Eingriff der CK2 dort erfolgen. Es stellte sich die Frage, ob, wenn nicht durch Veränderung der Expression, eine Veränderung der posttranslationalen Modifikation der beiden Proteine ausschlaggebend sein könnte. Herr Zimmer identifizierte C/EBP δ als Substrat der CK2 und ich konnte in meiner Diplomarbeit die Phosphorylierungsstelle durch Herstellung von Phosphorylierungsmutanten auf Serin 57 eingrenzen. Weitere Untersuchungen zur Auswirkung der Phosphorylierung erfolgten in der Kolonkrebszelllinie HCT116 [154]. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine gute Transfizierbarkeit und sehr geringe endogene C/EBP δ -Expression aus, weshalb sie gut für die

Charakterisierung geeignet ist. Hier werden nun die neueren Ergebnisse zu C/EBP δ und seiner Phosphorylierung durch die CK2 vorgestellt.

6.3.4.1 Analyse der CK2-Phosphorylierung von C/EBP δ

Es konnte bereits gezeigt werden, dass C/EBP δ ein Phosphoprotein ist und von der GSK3 β phosphoryliert wird [155-157]. Die Bestimmung der CK2-Phosphorylierungsstelle erfolgte *in vitro* durch die Phosphorylierung von gereinigtem C/EBP δ mit gereinigtem CK2-Holoenzym [154]. Zur Überprüfung, ob die CK2 C/EBP δ auch *in vivo* phosphoryliert, wird der Phosphorylierungsstatus von C/EBP δ nach Transfektion in HCT116 Zellen untersucht. Die Untersuchung erfolgt mit dem ProQ[®] Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit, das spezifisch phosphorylierte Proteine auf einer Membran anfärben kann. In einem ersten Schritt wird überprüft, ob das verwendete Kit C/EBP δ als Phosphoprotein erkennt. Dazu werden HCT116 Zellen mit FLAG-C/EBP δ transfiziert und es werden Cytoplasma- und Zellkernextrakte hergestellt. Mit einem C/EBP δ -spezifischen Antikörper wird das FLAG-C/EBP δ aus dem Zellkernextrakt präzipitiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran werden die phosphorylierten Proteine mittels ProQ[®]-Färbelösung angefärbt und detektiert. Darauf folgt die Färbung aller Proteine mit Ponceau-Rot. Das FLAG-C/EBP δ kann anschließend mit einem Anti-FLAG Antikörper nachgewiesen werden. In einem zweiten Schritt werden die HCT116 Zellen nach der Transfektion mit DMSO, 50 μ M Q oder 10 μ M CX-4945 behandelt. Anhand der PhosphoStain-Intensität der Immunpräzipitate können die Phosphorylierungsstadien des FLAG-C/EBP δ im ungehemmten und gehemmten Zustand verglichen und so eine *in vivo* Phosphorylierung der CK2 bestätigt oder widerlegt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt.

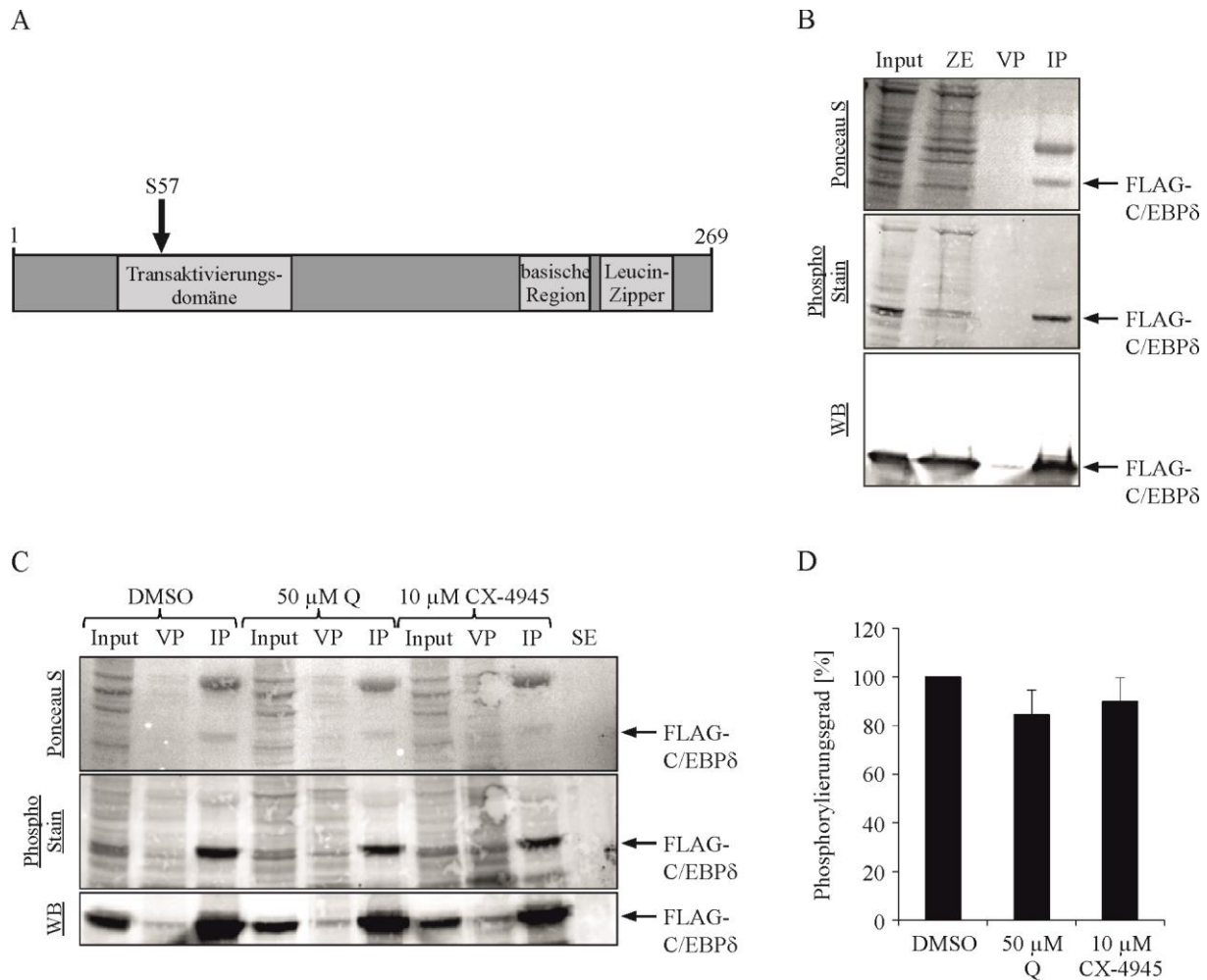


Abbildung 29: Anfärbung von phosphorylierten Proteinen nach Immunpräzipitation von FLAG-C/EBPδ.

(A) Schematische Darstellung des humanen C/EBPδ mit Kennzeichnung der CK2-Phosphorylierungsstelle Serin 57 (S57), der Transaktivierungsdomäne (AS 41–108 [158, 159]), der basischen Region (AS 195–222) und des Leucin-Zippers (AS 226–254 [www.uniprot.org]). (B, C) HCT116 Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit 8 μg des Plasmids p3xFLAG/CMV7.1 C/EBPδ_{WT} transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen geerntet (B) oder nach 6 h werden sie für weitere 18 h mit DMSO, 50 μM Q oder 10 μM CX-4945 behandelt und geerntet (C). Nach Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten wird mit je 500 μg des Zellkernextrakts eine Immunpräzipitation durchgeführt. FLAG-C/EBPδ wird mit 2 μg des spezifischen Antikörpers sc-636 präzipitiert. Die Ansätze werden in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Phosphorylierte Proteine werden mithilfe des ProQ® Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit gefärbt und mit dem Typhoon-Trio System unter Benutzung des 580-nm Band-Pass Filters (580 BP 30) detektiert. Danach werden mit Ponceau S-Lösung alle Proteine sichtbar gemacht. FLAG-C/EBPδ wird mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 nachgewiesen. Als "Input" dient 5% des eingesetzten Zellkernextrakts. ZE: Zellkernextrakt nach der Immunpräzipitation, VP: Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat, SE: Sepharosekontrolle, WB: Western Blot. (D) Quantifizierung der PhosphoStain-Intensität der Immunpräzipitate aus (C) mit der Software ImageQuant TL. Die Ergebnisse werden auf die im Western Blot erhaltenen Signale normiert. Die Signalstärke von DMSO wird als 100% definiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Struktur von C/EBP δ ist mit seinen funktionellen Domänen in Abb. 29 A schematisch dargestellt. Anhand des Schemas lässt sich erkennen, dass die Phosphorylierungsstelle der CK2 innerhalb der Transaktivierungsdomäne liegt. Abb. 29 B, mittleres Feld, zeigt, dass es sich bei C/EBP δ , wie erwartet, um ein stark phosphoryliertes Protein handelt. Im "Input" ist FLAG-C/EBP δ fast als einziges Protein angefärbt obwohl der Vergleich mit der Ponceau S Färbung (oberes Feld) erkennen lässt, dass es bei weitem nicht das am stärksten exprimierte Protein ist. Die immunologische Detektion mit dem FLAG-Antikörper beweist, dass es sich bei dem immunpräzipitierten Protein tatsächlich um FLAG-C/EBP δ handelt. Die Hemmung der CK2 mit 50 μ M Q und 10 μ M CX-4945 bewirkt eine leichte Abschwächung des PhosphoStain-Signals im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 29 C, mittleres Feld). Die Quantifizierung in Abb. 29 D bestätigt, dass die Phosphorylierung durch die CK2 nur etwa 10-15% des Phosphorylierungssignals ausmacht. Die Tatsache, dass sich das Signal nach CK2-Hemmung verringert, beweist jedoch, dass C/EBP δ endogen von der CK2 phosphoryliert wird, also auch *in vivo* ein Substrat ist. Das nach CK2-Hemmung verbleibende PhosphoStain-Signal hingegen bestätigt die Berichte, wonach C/EBP δ noch durch mindestens eine andere Kinase phosphoryliert wird.

6.3.4.2 Analyse der Interaktion von C/EBP δ und CK2

Nachdem nun bewiesen wurde, dass C/EBP δ auch *in vivo* von der CK2 phosphoryliert wird, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die CK2 auch an C/EBP δ bindet. Dazu werden HCT116 Zellen mit FLAG-C/EBP δ_{WT} transfiziert und aus dem daraus hergestellten Zellkernextrakt FLAG-C/EBP δ mit einem C/EBP δ -spezifischen Antikörper präzipitiert. Nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran können C/EBP δ und CK2 mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Sollte eine Bindung der CK2 an C/EBP δ stattgefunden haben, müsste man im IP auch ein Signal für die CK2 nachweisen können.

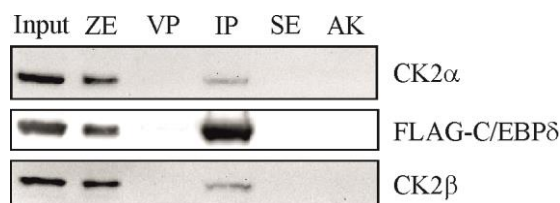


Abbildung 30: Co-Immunpräzipitation von FLAG-C/EBP δ und CK2 in HCT116 Zellen. HCT116 Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit dem p3xFLAG/CMV7.1 C/EBP δ_{WT} Plasmid transfiziert.

Nach 24 h werden die Zellen geerntet und Cytoplasma- und Zellkernextrakte daraus hergestellt. Mit 500 µg des Zellkernextrakts wird eine Immunpräzipitation durchgeführt. FLAG-C/EBPδ wird mit 2 µg des spezifischen Antikörpers sc-636 über 3 h präzipitiert. Die Ansätze werden in einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. FLAG-C/EBPδ wird mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 nachgewiesen, CK2α und β mit den spezifischen Antikörpern 1A5 und 6D5. Als "Input" dient 5% des eingesetzten Zellkernextrakts. ZE: Zellkernextrakt nach der Immunpräzipitation, VP: Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat, SE: Sepharosekontrolle, AK: Antikörperkontrolle.

Die Co-Immunpräzipitation in Abb. 30 bestätigt, dass die CK2 auch *in vivo* an C/EBPδ bindet. In der IP Spur sind zwar schwache, jedoch eindeutige Banden für CK2α und β zu erkennen. Die VP, SE und AK Spuren sind sauber und schließen damit eine unspezifische Bindung bzw. ein unspezifisches Signal aus.

Neben der Phosphorylierung findet also auch eine Bindung der CK2 an C/EBPδ statt. Ob dies eine Enzym-Substrat-Interaktion oder eine davon unabhängige Bindung darstellt, kann durch die Co-IP nicht erschlossen werden.

6.3.4.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von C/EBPδ

Damit ein Transkriptionsfaktor seine Funktion ausüben kann, muss er sich im Zellkern befinden. In meiner Diplomarbeit untersuchte ich deshalb die subzelluläre Lokalisation der Phosphorylierungsmutanten FLAG-C/EBPδ_{S57A} und _{S57D} im Vergleich zum Wildtyp, um herauszufinden, ob die Phosphorylierung an Serin 57 diese beeinflusst. Ich konnte feststellen, dass sich die Lokalisation des C/EBPδ durch Mutation des Serins nicht verändert. Die Proteine befanden sich alle im Zellkern [154]. Da nie ausgeschlossen werden kann, dass sich durch die Mutation einer Aminosäure die komplette Struktur eines Proteins verändert, wird hier nun die subzelluläre Lokalisation des FLAG-C/EBPδ_{WT} nach Hemmung der CK2 mit 50 µM Q oder 10 µM CX-4945 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle untersucht. Dazu werden HCT116 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach Transfektion mit FLAG-C/EBPδ_{WT} werden die Zellen mit DMSO oder den Inhibitoren behandelt. Der Nachweis des FLAG-C/EBPδ_{WT} erfolgt mit einem FLAG-spezifischen Antikörper in der Immunfluoreszenz.

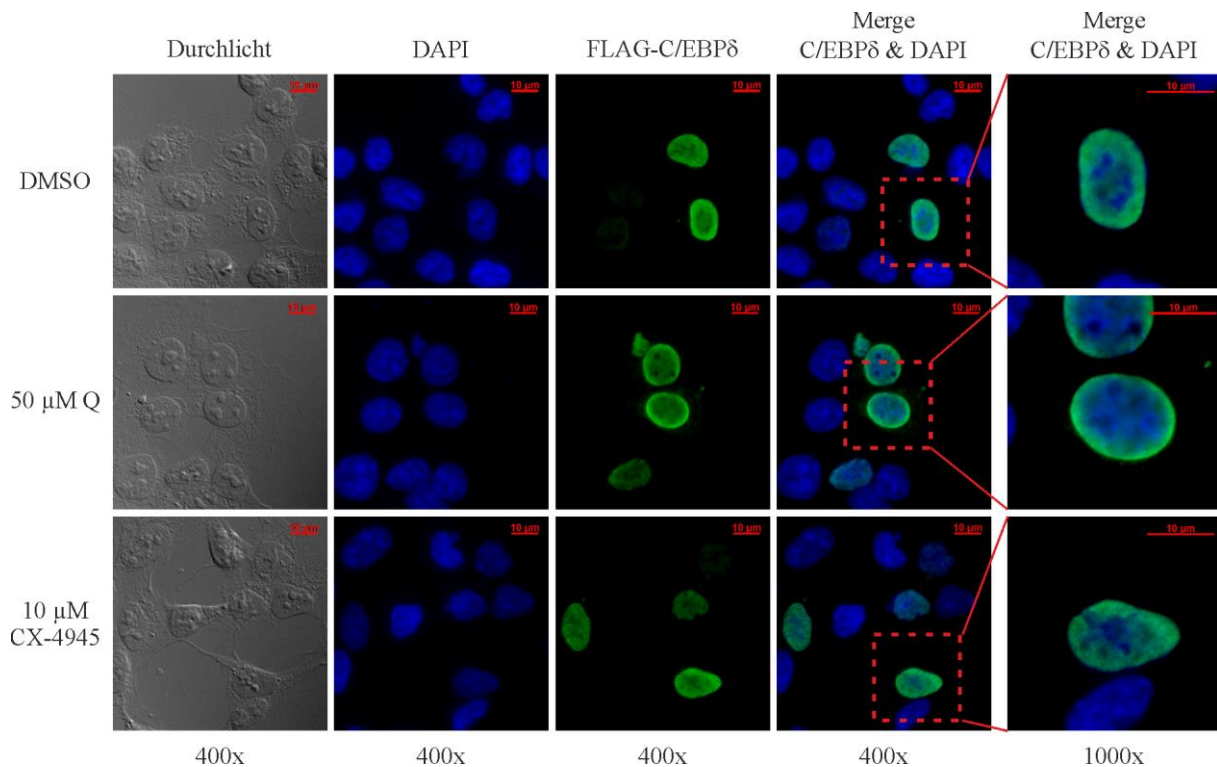


Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation von FLAG-C/EBP δ in HCT116 Zellen nach Hemmung der CK2. HCT116 Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und mit dem p3xFLAG/CMV7.1 C/EBP δ_{WT} Plasmid transfiziert. Nach 6 h wird das Medium gegen frisches Medium mit DMSO, 50 μ M Q oder 10 μ M CX-4945 ausgetauscht. Nach 18 h Inkubation werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Primärantikörper M2 gegen das FLAG-Tag inkubiert. Als Sekundärantikörper wird das Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Maus-IgG-Konjugat verwendet. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Die dargestellte Verteilung des FLAG-C/EBP δ wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Gesamtvergrößerung: 400x und 1000x, Maßstabbalken 10 μ m.

Abb. 31 zeigt repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz. In der DMSO-Kontrolle ist eine reine Kernfluoreszenz des FLAG-C/EBP δ zu beobachten. Die Verteilung des Proteins im Kern lässt dabei eine verstärkte Fluoreszenz am Rand des Kerns erkennen. Auch die Hemmung der CK2 mit Q und CX-4945 ändert nichts an der Kernlokalisation des FLAG-C/EBP δ . Auch hier ist die Fluoreszenz randständig stärker als in der Kernmitte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Phosphorylierung an Serin 57 durch die CK2 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des FLAG-C/EBP δ besitzt.

6.3.4.4 Analyse der Transaktivierungsfähigkeit von C/EBP δ

Eine weitere wichtige Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors ist seine Fähigkeit, die Transkription seiner Zielgene zu induzieren oder zu reprimieren. Posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, können die Transaktivierungsfähigkeit stark

beeinflussen [160, 161]. Da sich die Phosphorylierungsstelle der CK2 in der Transaktivierungsdomäne von C/EBP δ befindet (Abb. 29 A), ist ein Einfluss der Phosphorylierung darauf sehr wahrscheinlich.

Die Analyse der Transaktivierung erfolgt mithilfe des Luciferase-Assays, der die quantitative Bestimmung der Aktivität eines Zielpromotors ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit dient ein etwa 1.3 kb großer Teil des PPAR γ 2 Promotors als Zielpromotor. Dieser wurde aus genomischer DNA von 3T3-L1 Zellen mittels PCR amplifiziert und vor das Gen der Firefly-Luciferase kloniert. Durch die Überexpression von FLAG-C/EBP δ in HCT116 Zellen, kann der Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Aktivität des PPAR γ 2 Promotors untersucht werden. Die gleichzeitige Transfektion von CK2 α und β oder die Verwendung von Phosphorylierungsmutanten (FLAG-C/EBP δ _{S57A} bzw. FLAG-C/EBP δ _{S57D}) ermöglicht zudem die Untersuchung des Einflusses der CK2-Phosphorylierung auf die Transaktivierungsfähigkeit von C/EBP δ .

HCT116 Zellen werden mit einer Kombination aus Reporterkonstrukt und Expressionsplasmid(en) transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen lysiert und die Aktivierung des Promotors wird mittels Luciferase-Assay gemessen. Parallel dazu wird die Proteinexpression der FLAG-Fusionsproteine immunologisch überprüft, indem gleiche Proteinmengen in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem FLAG-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin.

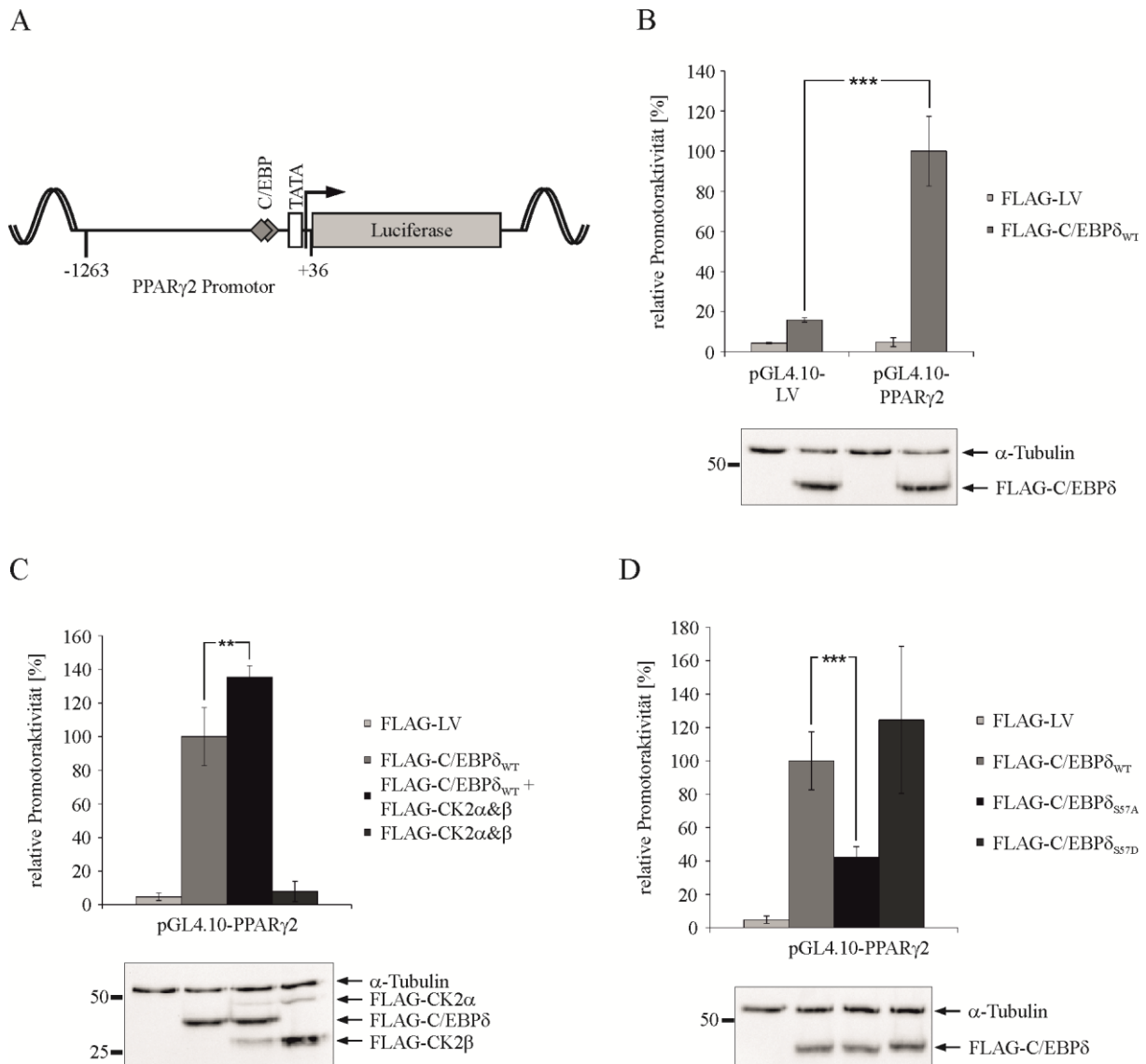


Abbildung 32: Transaktivierung des PPAR γ 2 Promotors durch FLAG-C/EBP δ . (A) Schematische Darstellung des verwendeten pGL4.10-PPAR γ 2 Konstrukts mit illustrierten C/EBP-Bindestellen und der TATA-Box. (B-D) HCT116 Zellen werden in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Die Transfektion findet als Co-Transfektion der Expressionsplasmide p3xFLAG/CMV7.1 C/EBP δ_{WT} (B) oder p3xFLAG/CMV7.1 C/EBP δ_{WT} , p3xFLAG/CMV7.1 CK2 α und p3xFLAG/CMV7.1 CK2 β (C) oder p3xFLAG/CMV7.1 C/EBP δ_{WT} , S57A und S57D (D) zusammen mit dem Promotorkonstrukt pGL4.10-LV (B) oder pGL4.10-PPAR γ 2 (B-D) statt. Das Plasmid p3xFLAG/CMV7.1 LV dient als Vektorkontrolle. Die Promotoraktivität wird 24 h nach Transfektion mittels Luciferase-Assay bestimmt. Die erhaltenen Werte werden auf den Proteingehalt der Zellextrakte bezogen. Anschließend werden die Werte für die Co-Transfektion von FLAG-C/EBP δ_{WT} und pGL4.10-PPAR γ 2 als 100% definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Experimenten. t-Test: **p<0.01, ***p<0.001. Die Expression der transfizierten Proteine wird parallel im Western Blot mit dem spezifischen FLAG-Antikörper M2 nachgewiesen. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin, das mit dem spezifischen Antikörper DM 1A detektiert wird.

Abb. 32 A zeigt das für die Analyse verwendete Reporterkonstrukt pGL4.10-PPAR γ 2. Es

umfasst den PPAR γ 2 Promotorbereich von bp -1263 bis +36 und enthält die beiden CCAAT-Boxen als Bindestellen der C/EBP Transkriptionsfaktoren und die TATA-Box. Direkt dahinter befindet sich das Luciferase-Gen, das als Reporter die Induktion des Promotors wiedergibt. Die in Abb. 32 B dargestellte Überprüfung des Reportersystems bestätigt die Funktionalität des Systems. Der pGL4.10-LV ohne Promotor wird zwar leicht durch die Co-Transfektion von FLAG-C/EBP δ_{WT} induziert, bleibt jedoch signifikant unter der Induktion des pGL4.10-PPAR γ 2-Konstrukts. Die Kontrolle der Transfektion im Western Blot zeigt, dass in beiden Proben, die FLAG-C/EBP δ enthalten, die Expression gleich stark ist. Abb. 32 C zeigt die Veränderung der Promotoraktivität bei gleichzeitiger Transfektion von FLAG-CK2 α und FLAG-CK2 β zusätzlich zu FLAG-C/EBP δ_{WT} . Wird die FLAG-CK2 zusammen mit FLAG-C/EBP δ überexprimiert, findet eine signifikant stärkere Aktivierung des PPAR γ 2 Promotors statt, wohingegen die Überexpression von FLAG-CK2 alleine keinen Effekt auf die Aktivierung des PPAR γ 2 Promotors besitzt. Dies deutet zum einen darauf hin, dass ohne CK2-Überexpression nicht alle FLAG-C/EBP δ Proteine in phosphorylierter Form vorliegen und zum anderen, dass die Phosphorylierung von FLAG-C/EBP δ durch die CK2 dessen Transaktivierungsfähigkeit erhöht. Die Untersuchung mit den Phosphorylierungsmutanten S57A und S57D in Abb. 32 D bestätigt dieses Ergebnis. Bei Überexpression von FLAG-C/EBP δ_{S57A} , der Mutante, die den unphosphorylierten Zustand widerspiegelt, reduziert sich die Transaktivierung des PPAR γ 2 Promotors signifikant auf etwa 40% des Wildtyps. Exprimiert man hingegen FLAG-C/EBP δ_{S57D} über, das mit der negativen Ladung den phosphorylierten Zustand imitiert, erhöht sich die Transaktivierung. Die Kontrolle der FLAG-C/EBP δ Expression im Western Blot zeigt, dass in allen Ansätzen gleiche Proteinmengen vorliegen.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass C/EBP δ *in vivo* ein Substrat und ein Bindepartner der CK2 ist. Die subzelluläre Lokalisation wird durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst, allerdings hat die Phosphorylierung einen positiven Effekt auf die Transaktivierungsfähigkeit von C/EBP δ .

6.3.5 Analyse des dem PPAR γ 2 vorgeschalteten Signalweges in 3T3-L1 Zellen

Für die Charakterisierung eines neuen CK2-Substrats bieten heterologe Systeme einige Vorteile, aber natürlich müssen die dort erhaltenen Ergebnisse letztlich im endogenen Differenzierungssystem überprüft und eingesetzt werden, wobei nicht immer alle

Untersuchungen eins zu eins umsetzbar sind. In der weiteren Analyse wird deshalb wieder im 3T3-L1 Zellsystem, unter Berücksichtigung der C/EBP δ -Erkenntnisse, C/EBP β , C/EBP δ und deren Rolle bei der Transaktivierung von PPAR γ 2 näher untersucht, da der Eingriff der CK2 in die Differenzierung auf dieser Ebene erfolgen muss.

6.3.5.1 Bestimmung des mRNA-Gehalts von C/EBP β und C/EBP δ

Zunächst wird der mRNA-Gehalt von C/EBP β und C/EBP δ während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen und nach Hemmung der CK2 mit Q untersucht. Auch hier werden keine abweichenden Ergebnisse mit CX-4945 erwartet. Differenzierende 3T3-L1 Zellen werden in Anwesenheit von DMSO oder 30 μ M Q an Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 mit dem peqGOLD TriFastTM Reagenz lysiert und die Gesamt-RNA wird isoliert. Aus dieser wird mit spezifischen Primern mittels qRT *real time* PCR die mRNA-Menge von C/EBP β und C/EBP δ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt.

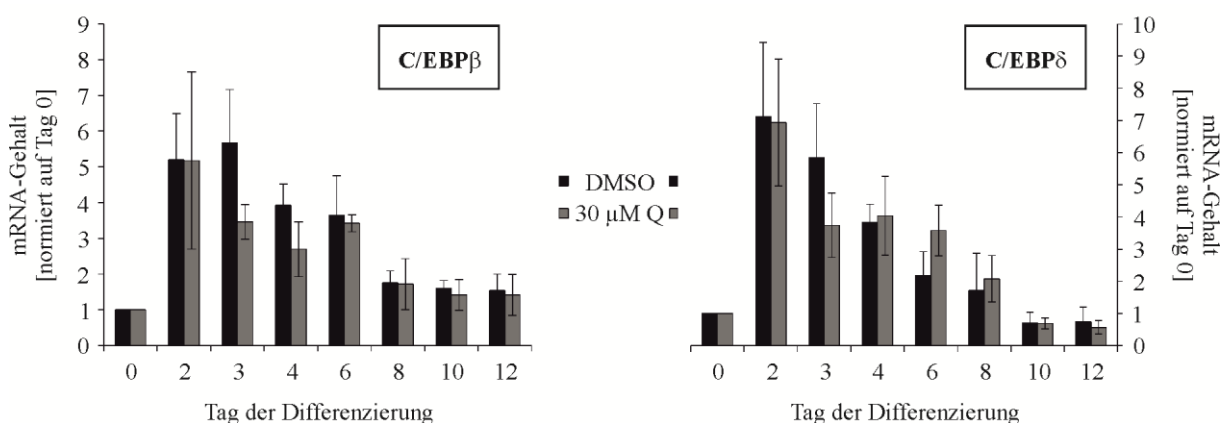


Abbildung 33: mRNA-Gehalt von C/EBP β und C/EBP δ während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen und nach Hemmung mit Quinalizarin (Q). Die Zellen werden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und in Anwesenheit von DMSO oder 30 μ M Q differenziert. An Tag 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 werden die Zellen mit dem peqGOLD TriFastTM Reagenz geerntet. Die Gesamt-RNA wird isoliert und mittels qRT *real time* PCR wird mit spezifischen Primern die mRNA-Menge von C/EBP β und C/EBP δ bestimmt. Die 18S rRNA dient als interne Kontrolle und die für die C/EBPs erhaltenen Werte werden darauf normiert. Die Ergebnisse der Analyse werden auf Tag 0 normiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

In der DMSO-Kontrolle steigen die mRNA-Mengen beider C/EBPs zu Beginn der Differenzierung an Tag 2 und 3 stark an und fallen anschließend zum Ende der Differenzierung hin wieder ab. Bei der Betrachtung des mRNA-Gehalts von C/EBP β bei

Hemmung der CK2 mit 30 μM Q zeigt sich ein ebenso starker Anstieg an Tag 2 wie bei der DMSO-Kontrolle. Die Abnahme des mRNA-Gehalts bis Tag 6 geht jedoch etwas schneller vonstatten. Bei C/EBP δ ist der Anstieg der mRNA-Menge an Tag 2 bei Hemmung ebenfalls gleich stark, verglichen mit der DMSO-Kontrolle. An Tag 3 fällt auch hier die mRNA-Menge bereits ab, obwohl sie bei der DMSO-Kontrolle etwa auf dem Niveau von Tag 2 bleibt. Dafür bleibt der mRNA-Gehalt der gehemmten Zellen an Tag 6 und 8 über dem der DMSO-Kontrolle.

Im Großen und Ganzen gibt es jedoch keine gravierenden Unterschiede in der mRNA-Menge zwischen ungehemmtem und gehemmtem Zustand, was sich auch in der von Frau Dr. Kostelnik und Herr Dr. Zimmer beobachteten konstanten Proteinexpression widerspiegelt.

6.3.5.2 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ

Wie in 6.3.4.3 gezeigt, hat die Hemmung der CK2 in HCT116 Zellen keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von FLAG-C/EBP δ . Da es sich dabei jedoch um ein heterologes System handelt, wäre es möglich, dass sich die Hemmung der CK2 in 3T3-L1 Zellen anders auswirkt. Es wäre auch denkbar, dass der Dimerisierungspartner von C/EBP δ , nämlich C/EBP β eine veränderte Verteilung aufweisen könnte. Deshalb wird nun die subzelluläre Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ in der Immunfluoreszenz in differenzierenden 3T3-L1 Zellen untersucht. Dazu werden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz in Anwesenheit von DMSO, 30 μM Q oder 15 μM CX-4945 differenziert. Nach 24 h (Tag 2) werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die beiden Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

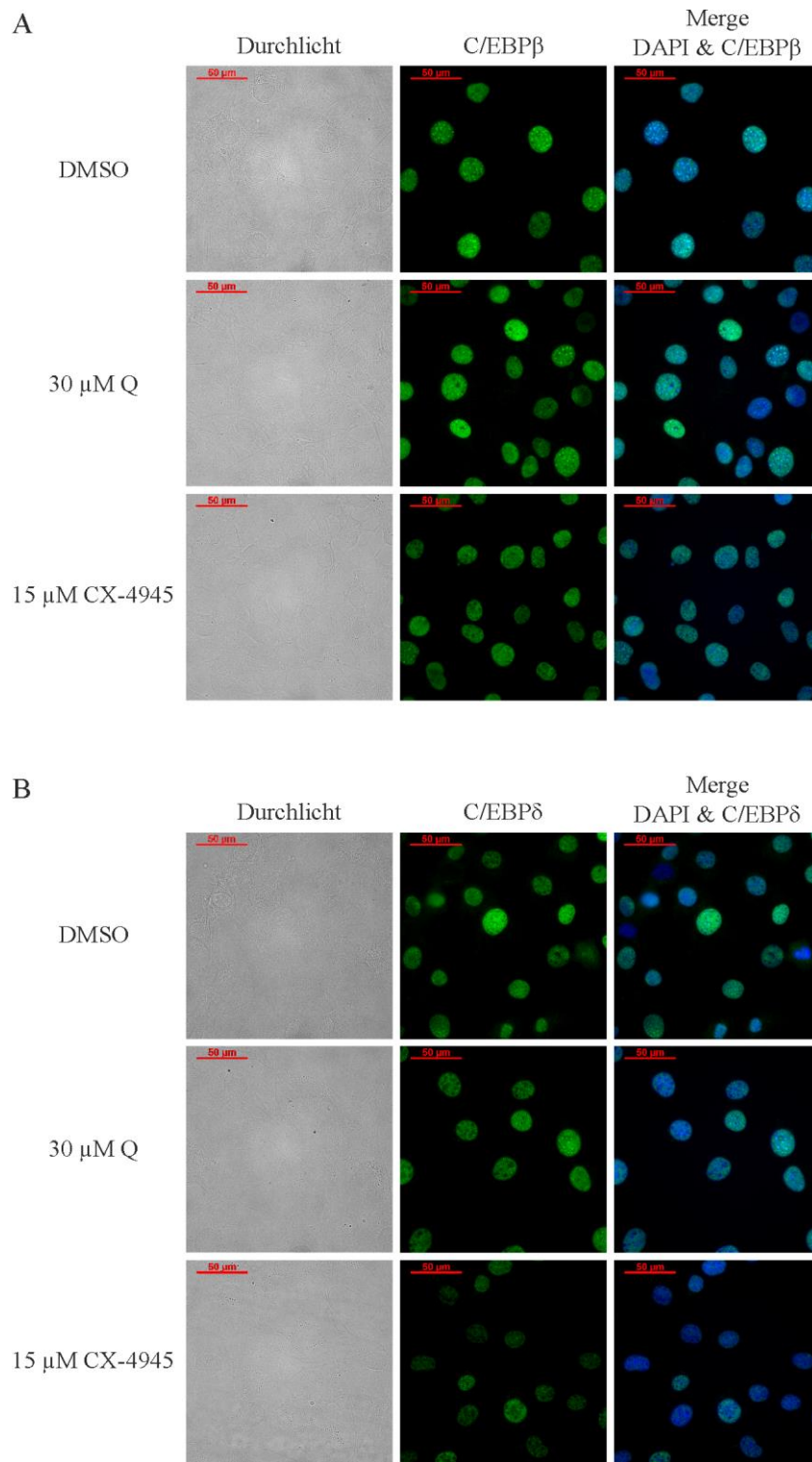


Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ in 3T3-L1 Zellen an Tag 2 der Differenzierung. Die Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert. Dem Differenzierungsmix wird DMSO, 30 µM Q oder 15 µM CX-4945 zugesetzt. Nach 24 h Inkubation werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den Primärantikörpern #3087 gegen C/EBP β und sc-151 gegen C/EBP δ inkubiert. Als Sekundärantikörper wird das Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Konjugate verwendet. Die DNA der Zellkerne ist mit DAPI gefärbt. Die dargestellte Verteilung wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Gesamtvergrößerung: 400x, Maßstabbalken 50 µm.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation in differenzierenden 3T3-L1 Zellen in Abb. 34 zeigt, dass sowohl C/EBP β (Abb. 34 A) als auch C/EBP δ (Abb. 34 B) an Tag 2 der Differenzierung ausschließlich im Kern lokalisiert sind. Auch die Hemmung der CK2 durch 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 ändert daran nichts. Es fällt auf, dass verschiedene Zellen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten aufweisen. Dies hängt möglicherweise mit dem Fortschritt des Differenzierungsstadiums zusammen.

Eine weitere Möglichkeit, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, ist die Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten. Die 3T3-L1 Zellen werden dazu in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz durch Zugabe des Differenzierungsmixes mit DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 differenziert. Die Zellen werden entweder ohne Behandlung geerntet (Tag 0) oder nach 24 h (Tag 2) oder nach 48 h (Tag 3). Nach Herstellung von Cytoplasma- und Zellkernextrakten werden gleiche Proteinmengen in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Expression von C/EBP β und C/EBP δ mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt.

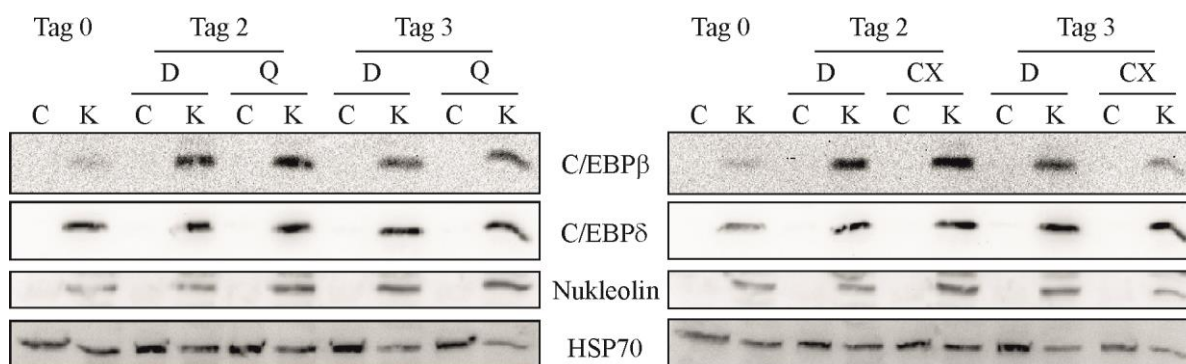


Abbildung 35: Expression von C/EBP β und C/EBP δ im Cytoplasma und im Zellkern von 3T3-L1 Zellen.

Die Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung in Anwesenheit von DMSO (D), 30 μ M Quinalizarin (Q) oder 15 μ M CX-4945 (CX) induziert. An Tag 0, 2 (24 h) und 3 (48 h) werden die Zellen geerntet. Es werden Cytoplasma- und Zellkernextrakte hergestellt und je 50 μ g Protein auf einem 12.5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran werden C/EBP β und C/EBP δ mit den spezifischen Antikörpern #3087 und sc-151 markiert und mithilfe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. HSP70 dient als Ladekontrolle der Cytoplasma-Proteine und wird mit SM5066 nachgewiesen. Nukleolin dient als Ladekontrolle der Zellkern-Proteine und wird mit dem Kaninchenserum #36 nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. C: Cytoplasma, K: Zellkern.

Die Expression von C/EBP β und C/EBP δ ist unabhängig von der Behandlung immer im Kern nachweisbar. Zudem wird mit diesem Experiment nochmals bestätigt, dass die Expressionsstärke der Proteine auch nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 vergleichbar mit der von DMSO ist. Die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen durch Nachweis der Expression von HSP70 (Cytoplasma) und Nukleolin (Kern) zeigen, dass die cytoplasmatische Fraktion keine Kernproteine enthält, die Kernfraktion jedoch noch einen geringen Anteil cytoplasmatischer Proteine. Dies ist im Falle einer Kernlokalisation jedoch irrelevant.

Das durch die Cytoplasma- und Kernfraktionierung erhaltene Ergebnis bestätigt somit die in der Immunfluoreszenz beobachtete Verteilung. Durch die Hemmung der CK2 wird die Kernlokalisation von C/EBP β und C/EBP δ in 3T3-L1 Zellen nicht verändert.

6.3.5.3 Bestimmung der DNA-Bindung von C/EBP β und C/EBP δ

Die Bindung an spezifische Sequenzen der DNA ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene induzieren oder reprimieren können. Da Proteinmenge und subzelluläre Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ nach Hemmung normal sind, wird im nächsten Schritt die Bindung der beiden Proteine an den PPAR γ 2 Promotor untersucht.

Dies geschieht mit einer Streptavidin-basierten Affinitätsreinigung (DNA-"pull-down"). Dazu wird ausgehend vom pGL4.10-PPAR γ 2 Plasmid ein 216 bp langes, die C/EBP-Bindestellen umfassendes Promotorstück mittels PCR amplifiziert (DNA-Sonde). Der reverse Primer ist dabei mit Biotin konjugiert, was die Aufreinigung über eine Streptavidin-Säule ermöglicht. Die biotinylierte DNA-Sonde wird mit Zellkernextrakten, die aus 3T3-L1 Zellen an Tag 2 oder Tag 3 der Differenzierung hergestellt wurden, inkubiert. Anschließend werden die Sonde und alle daran gebundenen Zellkernproteine aufgereinigt und die gebundenen Proteine von der Säule eluiert. Diese können anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, transferiert und immunologisch nachgewiesen werden.

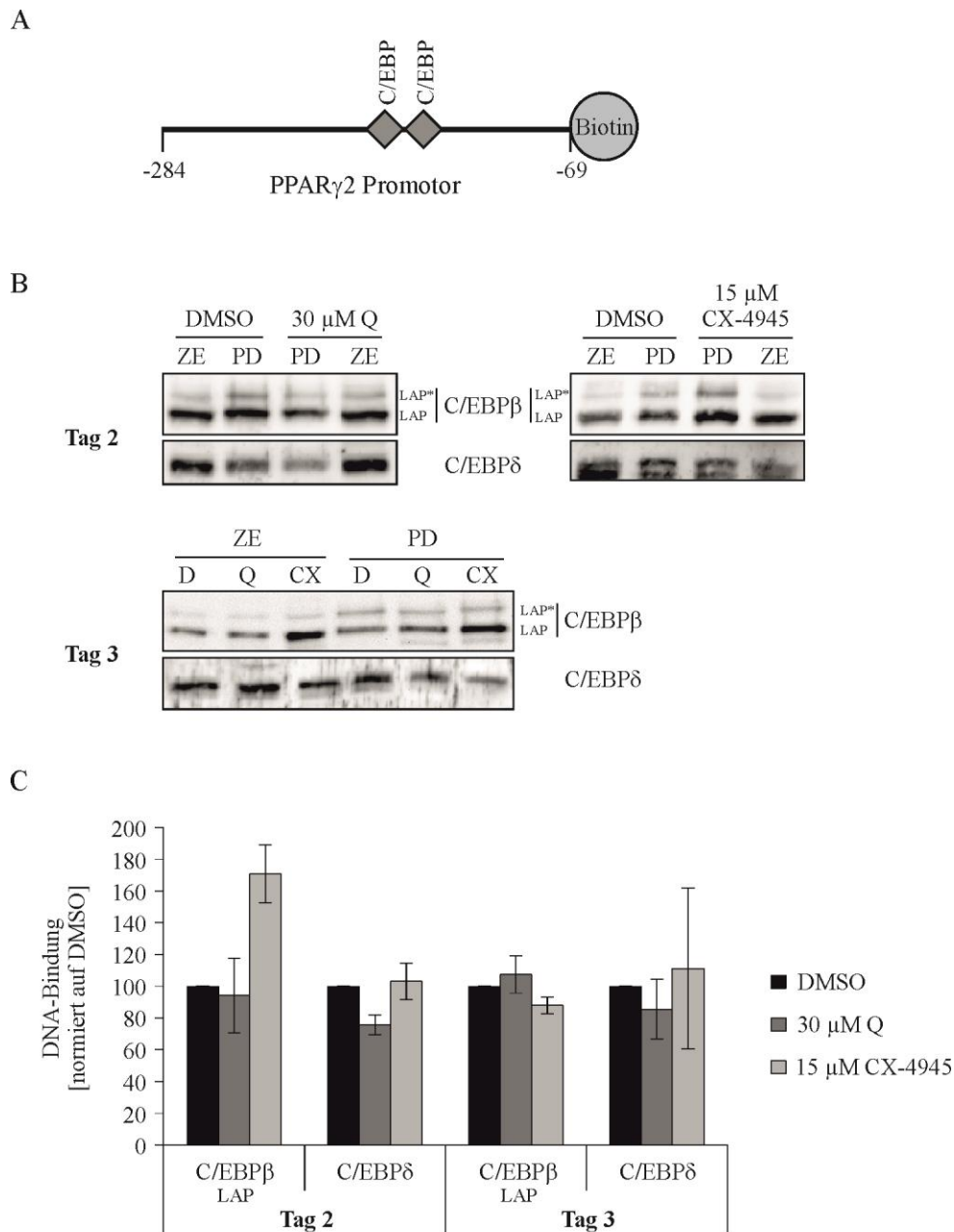


Abbildung 36: Bindung von C/EBP β und C/EBP δ aus 3T3-L1 Zellkernextrakten an den PPAR γ 2 Promotor nach Hemmung der CK2. (A) Schematische Darstellung der biotinylierten PPAR γ 2-Promotorsonde mit illustrierten C/EBP-Bindestellen. (B) Die 3T3-L1 Zellen werden auf 145 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird in Anwesenheit von DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 die Differenzierung induziert. An Tag 2 (24 h) oder Tag 3 (48 h) werden die Zellen geerntet und Cytoplasma- und Zellkernextrakte davon hergestellt. Je 1 mg der Zellkernextrakte wird für den DNA-"pull-down" (PD) mit 1 μ g der biotinylierten PPAR γ 2-Sonde versetzt und für 30 min inkubiert. Nach der Streptavidin-Affinitätsreinigung werden die Proteine im Eluat in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblotet. C/EBP β und C/EBP δ werden mit den spezifischen Antikörpern #3087 und sc-151 detektiert. ZE: Zellkernextrakt (30 μ g), D: DMSO. (C) Densitometrische Quantifizierung der in mindestens zwei unabhängigen Experimenten erhaltenen Banden für C/EBP β LAP und C/EBP δ mit der Software Quantity One 4.6.5. Die Intensität der DMSO-Kontrolle ist als Referenz (100%) gewählt.

Abb. 36 A stellt die zum "pull-down" (PD) verwendete DNA-Sonde dar. Sie umfasst den PPAR γ 2 Promotorbereich von bp -284 bis -69 und enthält die beiden C/EBP-Bindestellen. Am 3'-Ende ist die DNA-Sonde mit Biotin konjugiert, was die Aufreinigung über eine Streptavidin-gekoppelte Säule ermöglicht. Der Nachweis der Expression von C/EBP β und C/EBP δ in den PD-Spuren (Abb. 36 B) zeigt, dass beide Proteine an Tag 2 und Tag 3 der Differenzierung an die PPAR γ 2-Sonde binden. Nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 verändert sich die Bindungsstärke teilweise. Die in Abb. 36 C dargestellte Quantifizierung der Bindung im Mittelwert über mehrere Experimente zeigt, dass die Inhibitoren die Bindung unterschiedlich beeinflussen. Nach Hemmung mit Q ändert sich die DNA-Bindung von C/EBP β an Tag 2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kaum, wohingegen sie an Tag 3 leicht erhöht ist. Die DNA-Bindung von C/EBP δ wird an beiden Tagen durch Q negativ beeinflusst, wobei der Einfluss an Tag 2 deutlicher ist. CX-4945 hingegen übt keinen Effekt auf die DNA-Bindung von C/EBP δ aus, dafür bindet C/EBP β an Tag 2 der Differenzierung nach CX-4945 Behandlung deutlich besser und an Tag 3 etwas schlechter verglichen mit DMSO.

Da die Inhibitoren unterschiedliche Effekte auf die DNA-Bindung von C/EBP β und C/EBP δ zeigen, kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die Effekte sind jedoch allgemein nicht so weitreichend, dass daraus die nach der CK2-Hemmung beobachtete fehlende PPAR γ Expression erklärt werden könnte. Der Eingriff der CK2 findet somit vermutlich nicht auf der Ebene der DNA-Bindung statt.

6.3.5.4 Bestimmung der Aktivität des PPAR γ 2 Promotors

Neben der Kernlokalisierung und der DNA-Bindung ist die Transaktivierungsfähigkeit von ausschlaggebender Bedeutung für die Funktion von Transkriptionsfaktoren. Die in 6.3.4.4 dargestellte Analyse der Transaktivierungsfähigkeit von FLAG-C/EBP δ zeigt eine Erhöhung der Transaktivierung durch die Phosphorylierung an Serin 57. Im Umkehrschluss müsste die Hemmung der CK2 und somit die Verringerung der Phosphorylierung eine Reduktion der Transaktivierung von C/EBP δ bewirken. Zudem wäre eine geringere Aktivierung des PPAR γ 2 Promotors die einfachste Erklärung für die fehlende bzw. verminderte PPAR γ 2 mRNA- und Proteinexpression nach CK2-Hemmung. Die Analyse von exogen eingebrachtem C/EBP δ in 3T3-L1 Zellen ist jedoch durch den hohen endogenen C/EBP δ -Gehalt schlecht möglich. Deshalb wird hier die Transaktivierung des pGL4.10-PPAR γ 2 Promotorkonstrukts durch die endogen während der Differenzierung induzierten Transkriptionsfaktoren in

ungehemmten und gehemmten Zellen untersucht. Dazu werden 3T3-L1 Zellen in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät und mit dem pGL4.10-LV oder dem pGL4.10-PPAR γ 2 Plasmid transfiziert. Da kein Expressionsplasmid mittransfiziert wird, ist eine Überprüfung der Transfektionseffizienz im Western Blot nicht möglich. Aus diesem Grund wird das Renilla-Luciferase-Kontrollplasmid pGL4.70[*hRluc*] cotransfiziert, das die Transfektionseffizienz widerspiegelt und auf das die Ansätze normiert werden können. In den transfizierten Zellen wird die Differenzierung in Anwesenheit von DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 induziert und an Tag 2 (24 h) und Tag 3 (48 h) der Differenzierung wird die Induktion des PPAR γ 2 Promotors mittels Luciferase-Assay bestimmt.

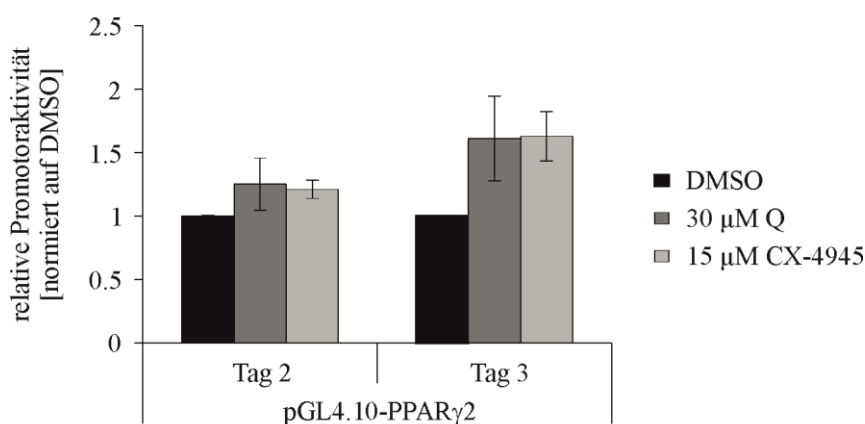


Abbildung 37: Transaktivierung des PPAR γ 2 Promotors während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen und bei Hemmung der CK2. Die Zellen werden in einer Dichte von 1.5×10^4 Zellen/Loch in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag mit dem Promotorkonstrukt pGL4.10-LV oder pGL4.10-PPAR γ 2 transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wird das pGL4.70[*hRluc*] Plasmid im Verhältnis 1:10 mittransfiziert. Nach 16 h wird die Differenzierung in Anwesenheit von DMSO, 30 μ M Q oder 15 μ M CX-4945 induziert. Die Promotoraktivität wird an Tag 2 (24 h) und an Tag 3 (48 h) nach Differenzierungsbeginn mittels Dual-Luciferase-Assay bestimmt. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz werden die Firefly-Luciferase-Werte durch die Renilla-Luciferase-Werte geteilt. Anschließend werden die Werte der DMSO Kontrollen als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Entgegen den Erwartungen nimmt die PPAR γ 2 Promotoraktivität nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q und 15 μ M CX-4945 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu und zwar um das 1.2-fache an Tag 2 und das 1.6-fache an Tag 3 der Differenzierung (Abb. 37).

Der Eingriff der CK2 in die Differenzierung erfolgt also auch nicht durch Veränderung der Transaktivierung des PPAR γ 2 Promotors, wie es durch den Einfluss der C/EBP δ -Phosphorylierung auf dessen Transaktivierungsfähigkeit zu erwarten gewesen wäre (vgl. Abb. 32).

6.3.5.5 Bestimmung des Gehalts der für PPAR γ 2 spezifischen miRNAs

Da der PPAR γ 2 Promotor offensichtlich auch bei Hemmung aktiviert wird, muss die Regulation der Proteinexpression auf posttranskriptioneller Ebene stattfinden. Ein relativ neues und großes Feld dabei ist die RNA-Interferenz über miRNAs. MiRNAs sind kleine nichtkodierende RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch an die 3'-UTR, seltener auch an die 5'-UTR, von mRNA Molekülen binden und zu deren Abbau oder einem Translationsstop führen. Da in den gehemmten Zellen eine deutlich verringerte PPAR γ 2 mRNA-Menge bei gleichzeitiger Aktivierung des PPAR γ 2 Promotors vorliegt, wäre ein verstärkter Abbau der mRNA durch miRNAs denkbar. Im Kontext der Differenzierung wurden bereits mehrere miRNAs beschrieben, die PPAR γ 2 als Ziel-mRNA besitzen und dadurch einen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung ausüben [53, 162-165]. Die am besten charakterisierten miRNAs miR-27a, miR-27b, miR-130a und miR-130b werden deshalb nun auf ihre Expression hin untersucht. Auch für dieses Experiment wurde lediglich der CK2-Hemmstoff Q verwendet, da für CX-4945 das gleiche Ergebnis erwartet wird. Die 3T3-L1 Zellen werden ausgesät und in Anwesenheit von DMSO oder 30 μ M Q differenziert. An Tag 0, 2, 4, 8 und 12 werden die Zellen mit dem peqGOLD TriFast™ Reagenz lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Gleiche Mengen an RNA werden in einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und damit vernetzt. Der Nachweis der miRNAs erfolgt mit Hilfe von radioaktiv markierten komplementären Sonden.

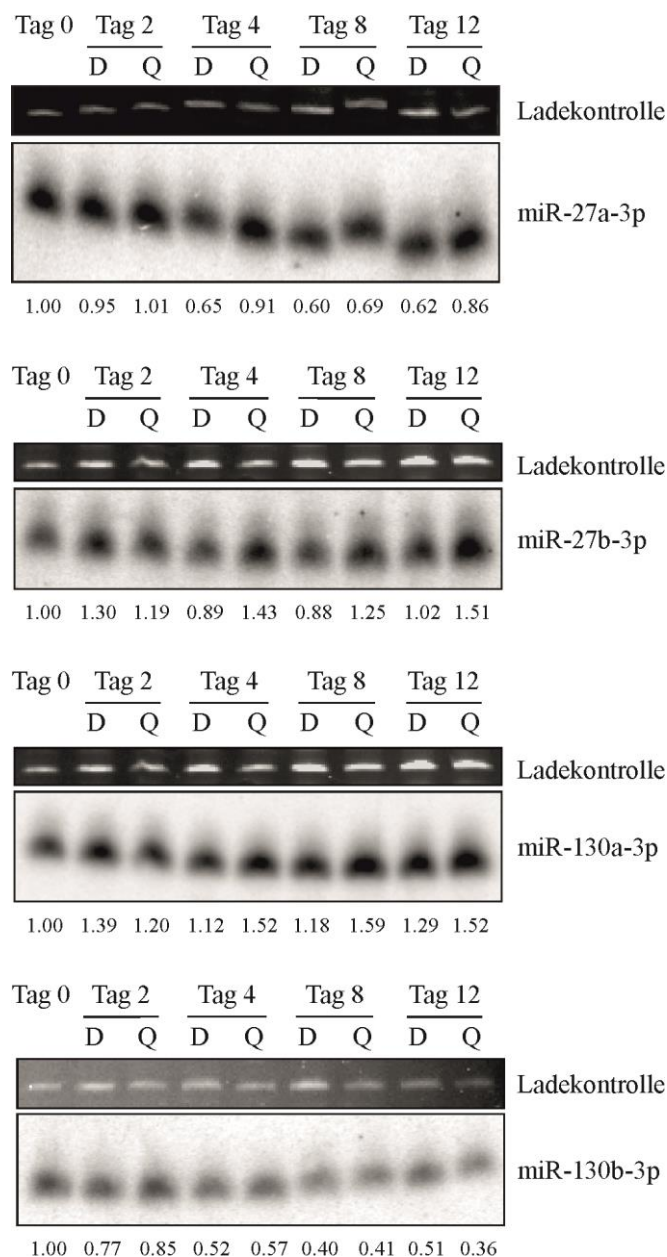


Abbildung 38: Menge der miRNAs miR27a-3p, -27b-3p, -130a-3p und -130b-3p während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen und nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q. Die 3T3-L1 Zellen werden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung mit DMSO- oder 30 μ M Q-haltigem Differenzierungsmix induziert. An Tag 0, 2, 4, 8 und 12 werden die Zellen mit dem peqGOLD TriFast™ Reagenz geerntet. Nach Isolation der Gesamt-RNA werden 20 μ g in einem 12%-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran gebロットet und dort kovalent fixiert. Aus einem dsDNA-Template wird mit der T7-RNA-Polymerase und [32 P]- α -UTP die radioaktiv markierte Sonde hergestellt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 50°C. Das radioaktive Signal wird mittels Phosphor Imaging-Platte auf dem Typhoon-Trio Imager detektiert. Die aufgetrennte RNA wird vor dem Transfer mit Ethidiumbromid angefärbt und dient als Ladekontrolle. Die Zahlen unter den Abbildungen geben die densitometrische Quantifizierung der erhaltenen Signale mit der Software Image Quant wieder. Die erhaltenen Intensitäten werden auf die Ladekontrolle normiert und die Intensität an Tag 0 ist als Referenz (1.00) gewählt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Die in Abb. 38 dargestellte Analyse der miRNA Expression zeigt, dass alle untersuchten miRNAs in 3T3-L1 Zellen nachweisbar sind. Bei näherer Betrachtung können auch Unterschiede in der Expression beobachtet werden. Die miRNAs miR-27a und -130b scheinen während der Differenzierung abzunehmen, während miR-130a eher zuzunehmen scheint. Die miRNA miR-27b nimmt im Kontrollansatz zunächst zu, anschließend ab und ist an Tag 12 wieder auf dem Niveau von Tag 0 angelangt. Die Quantifizierung der miRNAs bestätigt diese Beobachtung. Bei der DMSO-Kontrolle zeigt miR-27a die stärkste Abnahme auf 0.60 und miR-130b auf 0.40 an Tag 8 der Differenzierung. Interessant ist jedoch, dass die miRNA Expression nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M Q bis auf wenige Ausnahmen deutlich höher ist als bei der DMSO Kontrolle.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Proteinkinase CK2 möglicherweise etwas mit der Regulation der miRNA-Expression, -Prozessierung oder dem -Abbau zu tun haben könnte. Rechnet man zudem alle vier miRNAs zusammen, könnte dies einen größeren Effekt auf die PPAR γ 2 Expression ausüben als bei Betrachtung der einzelnen miRNAs.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sich bei der Regulation der Adipogenese um einen komplexen Prozess handelt und die Rolle der CK2 nicht auf einen bestimmten Angriffspunkt eingegrenzt werden kann. Während der adipogenen Differenzierung ändert sich die Expression, Aktivität und subzelluläre Lokalisation der CK2; in 3T3-L1 und hMSC zeigen sich jedoch unterschiedliche Resultate. In beiden Zellen wird nach Hemmung der CK2 das wichtige Regulatorprotein PPAR γ 2 funktionsunfähig; bei 3T3-L1 durch die fehlende Synthese, in hMSC durch den Transport ins Cytoplasma. Aufgrund dieser Unterschiede stellt sich also die Frage, ob die CK2 während der adipogenen Differenzierung in hMSC und 3T3-L1 die gleichen Angriffspunkte besitzt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die beidem Systeme einzeln betrachtet werden müssen, auch wenn sie denselben biologischen Prozess widerspiegeln und das Resultat das Gleiche ist. Trotzdem kann eindeutig belegt werden, dass die CK2 sowohl für die adipogene als auch für die neurale Differenzierung wichtig ist. Eine weitere Gemeinsamkeit ist der Zeitpunkt der CK2-Beteiligung an diesen Prozessen. Bei beiden Modellen ist die CK2 am Anfang der Differenzierung am wichtigsten, was für eine Beteiligung an der Induktion der Differenzierung spricht. Zudem sind diese beiden Differenzierungsprozesse sicherlich nicht die einzigen, für die eine Beteiligung der CK2 benötigt wird, woraus sich mannigfaltige zukünftige Forschungsgebiete ergeben.

7. Diskussion

Die Entstehung von neuem Leben ist ein komplexer Prozess, der schon fast an ein Wunder der Natur grenzt und bei dem vieles schiefgehen kann. So werden viele Embryonen aufgrund von Defekten noch vor der Einnistung in die Gebärmutter abgestoßen, ohne dass die Frauen es überhaupt bemerken [166]. Aus einer einzelnen Zelle, der Zygote, entstehen während der Entwicklung insgesamt die über 30 Billionen (3×10^{13}) Zellen des Erwachsenen mit den unterschiedlichsten Funktionen und Stoffwechselleistungen [167]. Damit dies erreicht werden kann, codiert das Genom mit etwa 20.000 Genen [168, 169] für mindestens ebenso viele Proteine, deren Diversität sich durch posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität oder Spezifität regulieren, nochmals stark erhöhen lässt [170]. Manche der Proteine regulieren nur einen bestimmten Prozess, andere sind an vielen verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt; manche sind durch die Funktion anderer Proteine ersetzbar, bei anderen ist dies nicht möglich, weshalb sich ihr Fehlen in einem bestimmten pathologischen Phänotyp äußert. Zu diesen "anderen" Proteinen gehört das Enzym Proteinkinase CK2, das, als ubiquitäre konstitutiv aktive Kinase mit bisher über 300 beschriebenen Substraten [78], an einer Myriade von zellulären Prozessen beteiligt ist. Der "knock-out" von CK2 α oder CK2 β im Mausmodell führt zum Absterben der Nachkommen während der embryonalen Entwicklung [97-100]. Ein "knock-out" von CK2 α' hingegen beeinflusst lediglich die Spermatogenese, was dazu führt, dass männliche Nachkommen steril sind [70, 101]. Die CK2-Aktivität ist, im Gesamtembryo gemessen, während der späten Organogenese und frühen Gewebedifferenzierung (E12-E14) am höchsten [92], ihre Expression ist jedoch gewebsspezifisch reguliert und nicht überall gleich stark. Mestres *et al.* konnten zeigen, dass die CK2 generell in den epithelialen Bereichen fast aller Organe stärker exprimiert wird als im sekundären Mesenchym. Eine Ausnahme bilden lediglich die Vorläuferzellen für die Knorpel- und Knochenzellen, bei denen es sich vermutlich um mesenchymale Stammzellen handelt und die auch zu Fettzellen differenzieren können. Die starke Expression im Neuroepithel lässt auf eine Beteiligung der CK2 an der neuralen Differenzierung schließen [95].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schäfer aus Zweibrücken die Rolle der CK2 bei der neuralen Differenzierung untersucht. Dazu wurden neurale Stammzellen (NSC) aus der SVZ von zwei bis fünf Tage alten Mäusen isoliert, *in vitro* kultiviert und differenziert. Diese Region ist besonders interessant, da sie auch im adulten Tier noch NSC enthält, die kontinuierlich neue Neurone für den Riechkolben bilden, aber auch im Falle einer Verletzung an der Regeneration des umliegenden Gewebes

beteiligt sind [8, 9, 21]. Die einfachste Methode zur Untersuchung, ob ein bestimmtes Protein/Enzym während eines Prozesses wichtig ist, ist das Protein oder die Enzymaktivität aus dem Prozess zu entfernen. Im Falle eines Enzyms ist dies am einfachsten durchführbar, indem man einen Hemmstoff verwendet, der, sofern er membrangängig ist oder durch Endozytose von der Zelle aufgenommen wird, einfach ins Kulturmedium der Zellen appliziert werden kann. Dabei ist es natürlich wünschenswert, dass der Inhibitor spezifisch ist, also möglichst nur das gewünschte Enzym hemmt, um unerwünschte Nebeneffekte auszuschließen. Für die Proteinkinase CK2 sind einige Inhibitoren erhältlich, die mehr oder weniger spezifisch sind. In der Regel handelt es sich dabei um ATP-Analoga, also kompetitive Inhibitoren, die mit ATP um die Bindung im katalytischen Zentrum von CK2 α und CK2 α' konkurrieren. In dieser Arbeit wurden zwei Hemmstoffe dieser Art verwendet: Quinalizarin und CX-4945. Bei Quinalizarin handelt es sich um ein Tetrahydroxyanthrachinon-Isomer, das an 140 Kinasen auf seine Spezifität hin untersucht wurde und *in vitro* einen Ki-Wert von 55 nM besitzt [121, 124]. Das strukturell nicht mit Quinalizarin verwandte CX-4945 (Synonym: Silmitasertib) hat sogar einen Ki-Wert von 0.38 nM *in vitro* und wurde an 238 Kinasen getestet [123]. Zudem wird es zurzeit in klinischen Studien als Tumorthapeutikum erprobt [122]. Obwohl es im Kinasescreening sehr spezifisch für die CK2 war, konnten Kim *et. al.* 2014 einen CK2-unabhängigen Effekt von CX-4945 auf den Prozess des alternativen Spleißens nachweisen [171]. Bei der betroffenen Kinase handelte es sich um die Cdc2-like Kinase 2 (Clk-2). Zum Ausschluss unspezifischer Resultate empfiehlt sich daher die parallele Verwendung von mindestens zwei Inhibitoren.

In den Vorarbeiten zu diesem Projekt untersuchte Frau Bender den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von CX-4945 auf die Proliferation der SVZ-Neurosphären [128]. Dabei konnte sie, beginnend bei 10 μ M, eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation feststellen. Ich konnte zeigen, dass mit steigender Hemmstoffkonzentration eine verstärkte Reduktion der CK2-Kinaseaktivität auftritt. Man könnte also annehmen, dass die Stärke der Hemmung bzw. der Anteil an CK2-Restaktivität über die biologischen Auswirkungen der Hemmung bestimmt. Wenn die Restaktivität der CK2 nach Hemmung noch hoch genug ist, kann sie ihre Funktionen noch ausüben und die Hemmung hat keinen Effekt auf die Proliferation. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass man bei Konzentrationen unter 10 μ M CX-4945 keinen Einfluss auf die Proliferation der Neurosphären sieht. Frau Bender setzte für die Differenzierungsexperimente eine CX-4945-Konzentration von 20 μ M ein, was jedoch eine starke Toxizität auf die Zellen ausübte. Deshalb wurde in den Folgeexperimenten, so auch in dieser Arbeit, 10 μ M CX-4945 verwendet. Im Neurosphären-Assay bewirkte die

Hemmung der CK2 Kinaseaktivität mit CX-4945 eine Reduktion der astrozytären und eine Induktion der neuronalen Differenzierung, wenn die Hemmung von Beginn der Differenzierung an stattfand. Die Summe der beiden Zelltypen (Astrozyten + Neurone) änderte sich im Vergleich zur Kontrolle jedoch kaum, was darauf hindeuten könnte, dass keine Hemmung der Gesamtdifferenzierung stattfand, sondern eventuell nur eine Verschiebung des Differenzierungsschicksals in Richtung der Neurone. Es sind bereits einige Proteine bekannt, die an der Entscheidung, zu welchem Zelltyp eine NSC differenziert, beteiligt sind [172, 173]. Die "bone morphogenic proteins" (BMPs) werden für die astrozytäre Differenzierung in der SVZ benötigt [174, 175]. Die BMPs selbst sind zwar nicht als CK2 Substrate beschrieben, jedoch konnte für den BMP Rezeptor Typ-1a (BMPR-1a) gezeigt werden, dass CK2 β an drei verschiedenen Bereichen an ihn bindet und ihn dadurch inaktiviert [109]. Diese Bereiche enthalten auch potentielle CK2-Phosphorylierungsstellen, es ist aber noch nicht klar, ob diese tatsächlich durch die CK2 phosphoryliert werden. Die Ergebnisse von Son *et al.* deuten jedoch darauf hin, da eine Hemmung der CK2 Kinaseaktivität mit CX-4945 den BMP-2 induzierten Signalweg über MEK/ERK und Smad1/5/8 verstärkt, was zu einer gesteigerten Osteogenese führt [176]. Unter der Annahme, dass die CK2-Hemmung auch in den NSC das Signal verstärkt, müsste die Hemmung der CK2 eine verstärkte astrozytäre Differenzierung hervorrufen, was meinen Ergebnissen widersprechen würde. Neben seiner Funktion bei der Differenzierung zu Astrozyten ist der BMP-induzierte Signalweg über den BMPR-1a jedoch ebenfalls für die Erhaltung des Stammzellcharakters der NSC wichtig. So bewirkt der "knock-out" des BMPR-1a in embryonalen Stammzellen die vorzeitige Neurogenese und den Verlust des Stammzellcharakter der embryonalen Stammzellen [177]. Auch im adulten Hippocampus halten die BMPs die NSC über den BMPR-1a im Ruhemodus [178]. In den von mir untersuchten SVZ-Neurosphären scheint diese Funktion der BMPs im Vordergrund zu stehen, was durch die verstärkte Nestin-Expression nach CK2-Hemmung bestätigt wird. Das "Neurogenic locus notch homolog protein" (Notch) reguliert die Differenzierung zu allen neuralen Zelltypen sowie die Erhaltung der NSC zeitpunkt- und regionsabhängig [179-181]. Die intrazelluläre Domäne von Notch1 wird durch die CK2 phosphoryliert [182]. Die Phosphorylierung hat eine verringerte transkriptionelle Aktivität des Notch1/Mastermind/CSL-Komplexes zur Folge. Die Hemmung der CK2 bewirkt demnach vermutlich eine Steigerung des Notch-aktivierten Signalweges. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Notch im zentralen Nervensystem kann über die Folgen der CK2-Hemmung bezüglich Notch in den von mir untersuchten SVZ-Neurosphären jedoch nur spekuliert werden. Vermutlich trägt es ähnlich wie der BMP-Signalweg zur

Erhaltung der Stammzellpopulation bei. Neben der Gehirnentwicklung ist Notch bei vielen weiteren Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt [183], wobei es die Differenzierung sowohl positiv als auch negativ reguliert [184-187]. Die Regulation der BMPR-1a Aktivität und des Notch1-Signalwegs durch die CK2 stellt somit nicht nur bei der neuronalen Differenzierung einen Mechanismus zur Beeinflussung des zellulären Schicksals dar, sondern zeigt auch einen gemeinsamen Angriffspunkt der CK2 bei verschiedenen Differenzierungsprozessen auf. Bei der Neurogenese werden der CK2 sowohl positive als auch negative Effekte zugeschrieben. Der "Groucho/Transducin-like enhancer of split-1" (Gro/TLE1) wurde von Nuthall *et al.* als CK2 Substrat beschrieben [188, 189]. Nach der Bindung an "Hairy/Enhancer of split1" (Hes1) wirkt die Phosphorylierung an Serin239 durch die CK2 als Ausgangspunkt für die Hyperphosphorylierung von Gro/TLE1. Die Hyperphosphorylierung ist essentiell für die Umstrukturierung des Chromatins, wodurch die neuronale Differenzierung durch Transrepression proneuronaler Gene gehemmt wird. Der Verlust der Hyperphosphorylierung durch die Verwendung von CK2-Inhibitoren könnte auf diesem Wege zur gesteigerten Differenzierung der Neurone beitragen. Ein weiteres Substrat der CK2 ist Hes6, das als Gegenspieler von Hes1 bekannt ist und die kortikale Neurogenese fördert. Die CK2-Phosphorylierung von Hes6 beeinflusst die Bindung von Gro/TLE1 an Hes1 in negativer Weise und fördert die Degradation von Hes1 [190]. Die Hemmung der CK2 würde in diesem Fall also einen antineuronalen Effekt besitzen. Einen ebenfalls antineuronalen Effekt besitzt die Hemmung der CK2-Phosphorylierung von "Mammalian achaete-scute homolog 1" (Mash-1) [191]. Mash1 ist essentiell für die Neurogenese in bestimmten Regionen während der embryonalen Gehirnentwicklung [192], spielt jedoch auch in der postnatalen SVZ eine Rolle [193]. Die Entscheidung der Zelle für oder gegen die Differenzierung wird letztendlich dadurch bestimmt, welche Eigenschaften nach Einbezug aller Effekte überwiegen. In diesem experimentellen System überwiegen die proneuronalen Signale nach CK2-Hemmung. Die Ergebnisse deuten jedoch auch darauf hin, dass der positive Einfluss der CK2-Hemmung innerhalb der ersten 72 h der Differenzierung liegen muss, da eine Hemmung ab diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung mehr besitzt. Der negative Einfluss auf die astrogliale Differenzierung hingegen, ist auch bei späterer Hemmung noch vorhanden, wodurch die Gesamtdifferenzierung reduziert ist. Quinalizarin induziert bei Zugabe von Beginn der Differenzierung an Apoptose. Besonders empfindlich darauf reagieren die neuronalen Stammzellen und zwar vor allem die, die zu Neuronen differenzieren sollen. Ist die Differenzierung bereits unter normalen Bedingungen in Gang gesetzt (72 h) verlieren die Zellen ihre Empfindlichkeit gegenüber den apoptoseinduzierenden

Eigenschaften von Quinalizarin und zeigen ein sehr ähnliches Bild wie CX-4945. Stammzellen und Krebszellen weisen einige Gemeinsamkeiten auf. So sind beide Zelltypen unsterblich und umgehen die Apoptose. Beide Zelltypen neigen dazu im Körper zu wandern: Stammzellen zum Ort des Gewebeschadens und Krebszellen in Form von Metastasen. Die Hemmung der CK2 führt in Krebszellen zur Apoptose (zusammengefasst in [85]) und die Generierung von embryonalen CK2 $\beta^{-/-}$ Stammzellen zeigte sich unmöglich [97]. Bei ausdifferenzierten Zellen hingegen gibt es Hinweise darauf, dass sie nicht so empfindlich gegenüber einer CK2-Hemmung sind [194]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten stark darauf hin, dass sich die neuronalen Stammzellen wie Tumorzellen verhalten. Ist die Differenzierung jedoch erst in Gang gesetzt hat die CK2-Hemmung keinen Effekt mehr auf die Induktion der Apoptose. Die Tatsache, dass CX-4945 in der Konzentration von 10 μ M keine Apoptose induziert, ist vermutlich auf die relativ hohe CK2 Restaktivität von 60% in differenzierenden SVZ zurückzuführen. Die von Frau Bender eingesetzte Konzentration von 20 μ M reduzierte die CK2 Kinaseaktivität auf 18% Restaktivität, was zur Induktion der Apoptose führte [195]. Auch hier scheint also die verbleibende Aktivität der CK2 eine Rolle für die Zellvitalität zu spielen. Ein Einfluss der CK2 auf die Proliferation und Vitalität von NSC konnte von Huillard *et al.* auch bei der embryonalen Gehirnentwicklung nachgewiesen werden [103]. Dort bewirkte der spezifische "knock-out" von CK2 β in den NSC eine deutliche Reduzierung der Proliferation der Stammzellen. Zudem wurde die Differenzierung zu Oligodendrozyten, einem weiteren glialen Zelltyp, gehemmt. Auf molekularer Ebene könnte dies durch den Transkriptionsfaktor Olig2, der als Substrat der CK2 identifiziert wurde, reguliert werden. Die Differenzierung zu Oligodendrozyten wurde von mir nicht untersucht, da dieser Zelltyp nur einen kleinen Teil der differenzierten Zellen ausmacht (maximal 15%) und somit ein Effekt schwer auszumachen wäre. Im Hinblick auf die zuvor dargestellten Ergebnisse wäre es jedoch sehr interessant zu überprüfen, ob die CK2 auch während der postnatalen Entwicklung noch einen Einfluss auf die oligodendrozytäre Differenzierung ausübt. Dazu müsste die Differenzierung auf eine Weise eingeleitet werden, die die Entwicklung zu Oligodendrozyten fördert, um einen eindeutigen Effekt zu erzielen.

Bei der Betrachtung der möglichen Effekte einer *in vivo* Hemmung der CK2 müssen alle Ergebnisse zusammen berücksichtigt werden. Rückschlüsse auf die biologische Wirkung können jedoch nur auf die mit der SVZ assoziierten Funktionen gezogen werden, da die NSC des *Gyrus dentatus* nicht untersucht wurden. Die Reduktion der Proliferation der NSC in Kombination mit einer reduzierten astroglialen und einer, je nach Hemmstoffkonzentration, positiv oder negativ veränderten neuronalen Differenzierung könnten schwerwiegende Folgen

für das Gehirn haben. Die SVZ ist im adulten Gehirn für die Bereitstellung von Neuronen für den Riechkolben zuständig [8]. Die Funktion dieser bereitgestellten Neurone ist die Ausbildung neuer neuronaler Schaltkreise zur Verarbeitung neuer Gerüche (zusammengefasst in [196]). Eine gesteigerte oder verringerte Differenzierung dieser Neurone nach CK2-Hemmung könnte demnach zu einer gestörten Geruchswahrnehmung führen. Eine weitere Aufgabe der SVZ ist die Regeneration nach Hirnschäden [137]. So könnte die Regeneration von geschädigten Bereichen durch die Hemmung der CK2 stark reduziert sein, denn zum einen können aufgrund der reduzierten Proliferation der Stammzellen nicht genügend Vorläuferzellen für Astrozyten und Neurone bereitgestellt werden und zum anderen ist die Differenzierung zu Astrozyten ebenfalls verringert. In der Summe ist der Effekt also voraussichtlich noch deutlich stärker als bei Betrachtung der einzelnen Prozesse. Diese Überlegungen kommen natürlich nur zum Tragen, wenn sie in Form von unerwünschten Nebenwirkungen, wie nach Einnahme von CX-4945 als Tumorthapeutikum, auftreten. Sinnvoll kann der gezielte Einsatz von CK2-Inhibitoren bei Erkrankungen des Gehirns sein, in denen die CK2-Aktivität zur Pathogenese beiträgt, was oft der Fall ist. Als Beispiel wäre hier das Glioblastom anzuführen, bei dem es sich um einen aggressiven Tumor, bestehend aus Zellen mit astrozytären Eigenschaften, handelt. Diese können aus NSC oder durch Dedifferenzierung von Astrozyten entstehen [197]. Derzeit wird eine Beteiligung der SVZ bei der Entstehung von Glioblastomen diskutiert [198]. Glioblastome weisen eine erhöhte CK2-Aktivität auf und eine Hemmung bzw. Herunterregulation der CK2 reduziert effektiv das Tumorwachstum und induziert Apoptose [199-202]. Die CK2 bietet somit einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt zur Behandlung von Glioblastomen.

Neben der neuralen Differenzierung wurden bereits weitere Differenzierungsmodelle beschrieben, bei denen die CK2 eine Rolle spielt. Bei der Osteogenese, also der Bildung von Knochengewebe, wirkt sich eine Hemmung der CK2 über die reduzierte Aktivierung des "Receptor Activator of NF- κ B Ligand" (RANKL) negativ auf die Osteoklastendifferenzierung (Knochenabbau) aus. Die BMP-2 induzierte Osteoblastendifferenzierung (Knochenaufbau) hingegen wird positiv beeinflusst [176]. Die Regulation erfolgt dabei über den bereits erwähnten BMPR-1a. Wird die CK2 mit CX-4945 oder kompetitiven Peptiden gehemmt, erfolgt BMP-2 unabhängig eine verstärkte MEK/ERK-Aktivierung und die Zellen differenzieren [109, 203]. Die 27-29 AS großen kompetitiven Peptide entsprechen den potentiellen CK2-Phosphorylierungsstellen und ihrer flankierenden Regionen. Durch Anfügen der Antennapedia Homeodomäne-Signalsequenz wird die Aufnahme in die Zelle erreicht.

Wie bereits erwähnt ist eine Phosphorylierung der "Bindestellen" nicht nachgewiesen. Die Autoren beschreiben den Wirkmechanismus als kompetitive Hemmung der Bindung von CK2 an den BMPR-1a, das Peptid könnte meiner Meinung nach jedoch auch als kompetitives Substrat wirken. Untersuchungen zur Osteogenese im Mausmodell zeigten eine erhöhte Knochenmineralisierung nach Hemmung der CK2 mit dem kompetitiven Peptid CK2.3 [204]. Neben der Osteogenese ist die CK2 über den BMPR-1a auch an der Chondrogenese beteiligt. Der Einsatz des Peptids CK2.1 zeigte dahingehend im Mausmodell großes Potential und könnte zukünftig zur Behandlung von Knorpelbildungsdefekten eingesetzt werden [205]. Ein weiteres Differenzierungsmodell, für das bereits Beteiligungen der CK2 beschrieben wurden, ist die Myogenese (Muskeldifferenzierung). Dort beeinflusst die CK2 durch die Phosphorylierung von Paired Box 3 (Pax3) an Serin 205 und 209 die Entscheidung zwischen Proliferation und Differenzierung [107, 206-208]. Auch Pax7 wird von der CK2 phosphoryliert, was die für die Muskelregeneration wichtigen Satellitenzellen in ihrer undifferenzierten Form erhält [209]. Darüber hinaus werden eine Reihe weiterer früher myogener Transkriptionsfaktoren durch die CK2 phosphoryliert [106, 210, 211]. Auch für eine erfolgreiche Adipogenese ist die CK2 essentiell. Bereits 1987 konnten Sommercorn und Krebs nachweisen, dass sich die CK2-Aktivität während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen verändert [212]. Später stellte sich heraus, dass eine Hemmung der CK2 die Adipogenese ebenfalls hemmt, jedoch nur wenn die Hemmung zu frühen Zeitpunkten der Differenzierung erfolgte [113]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Bedeutung der CK2 bei der Adipogenese näher untersucht. Als Zellsysteme standen die murine Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 und in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut in St. Ingbert humane mesenchymale Stammzellen zur Verfügung. Beide Zellsysteme besitzen im direkten Vergleich sowohl Vor- als auch Nachteile. Vorteile der hMSC sind ihre Herkunft direkt aus menschlichem Gewebe, wodurch die Ergebnisse den *in vivo* Bedingungen besser entsprechen und unkomplizierter in Therapien umgesetzt werden können. Zudem können sie nicht nur zu Adipozyten, sondern auch zu Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren [27]. So können Einflüsse bestimmter Faktoren auf Krankheitsentwicklungen untersucht werden, denen eine Deregulation der Differenzierung zu den einzelnen mesenchymalen Zelltypen zugrunde liegt. Ein Beispiel wäre die Osteoporose, bei der im Alter, neben einer erhöhten Osteoklastendifferenzierung, bevorzugt Adipogenese zu Lasten der Osteoblastogenese erfolgt, was zur Demineralisierung der Knochen und einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt [213]. Nachteile der hMSC sind eine geringe Zellzahl und eine geringe Proliferationsfähigkeit. Allgemein verwendet man sie zur Untersuchung der

Differenzierung maximal bis zu einer Passage von 8. Die Zellen proliferieren danach zwar noch für eine begrenzte Zeit weiter, es kann jedoch passieren, dass sie ihre Differenzierungskapazität verlieren [214]. Dies hat zur Folge, dass nur eine begrenzte Anzahl an Experimenten durchgeführt werden kann, was eine genaue Planung voraussetzt. Zudem besitzen die hMSC im Vergleich zu Zelllinien wenig Protein, was Untersuchungen, für die man viel Protein benötigt, schwierig, wenn nicht sogar unmöglich macht. Die nachteiligen Eigenschaften primärer Zellen gleicht die Zelllinie 3T3-L1 durch eine hohe Proliferationskapazität und der Möglichkeit ihrer Verwendung bis zur 30. Passage aus, ohne dass die Ergebnisse stark voneinander abweichen oder die Zellen ihr Differenzierungspotential verlieren. Zusätzlich dazu ist in dieser Zelllinie die Manipulation durch Transfektion wesentlich einfacher als in Stammzellen. Nachteile der 3T3-L1 sind in der Tatsache begründet, dass sie von einem bestimmten Zellklon mit fettakkumulierenden Eigenschaften abstammen [24, 25] und sich somit nur noch zu Fettzellen entwickeln können. Zudem handelt es sich bei ihnen um Zellen aus der Maus, bei denen die Adipogenese nicht unbedingt so ablaufen muss wie beim Menschen. Auch wenn der grundsätzliche Signalweg, der die adipogene Differenzierung bewirkt, in 3T3-L1 und hMSC sehr ähnlich ist, gibt es auch signifikante Unterschiede. So benötigen die hMSC beispielsweise beide PPAR γ -Isoformen zur erfolgreichen Differenzierung [215], während 3T3-L1 Zellen nur auf PPAR γ 2 angewiesen sind [37]. Trotzdem handelt es sich bei beiden Zelltypen jedoch um anerkannte Adipogenese-Modelle. Ein weiteres Modellsystem, mit dem ich bereits gearbeitet habe, das jedoch nicht Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit ist, ist die Zelllinie C3H/10T1/2. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte mesenchymale Stammzelllinie aus einem C3H Mausembryo [216], die neben der Adipogenese, wie für MSC üblich, das Potential zur Differenzierung in weitere mesenchymale Zelltypen besitzt [217, 218]. Die C3H/10T1/2 sind somit zwischen den 3T3-L1 und den hMSC einzuordnen, da sie Eigenschaften beider Zellsysteme besitzen.

Zunächst wurde in den beiden verwendeten Zellmodellen die CK2-Expression und -Aktivität während der normalen adipogenen Differenzierung untersucht. Während in den 3T3-L1 Zellen die Expression und Aktivität im Gesamtextrakt bis Tag 4/6 der Differenzierung zu- und anschließend deutlich abnimmt [113], ist in Cytoplasmaextrakten zwar die Zu-, die darauf folgende Abnahme der CK2-Expression jedoch nur auf den Ausgangswert und nicht darunter zu beobachten. In Zellkernextrakten nimmt die Expression von CK2 α und β sogar kontinuierlich bis zu Tag 12 zu. In den hMSC ergab die Analyse der CK2 während der Differenzierung ein nochmals anderes Bild. Die Expression von CK2 α sowie die CK2-Aktivität im Gesamtzellextrakt nahmen von Beginn der Differenzierung an kontinuierlich auf etwa 50%

des Ausgangswertes ab. Die Expression von CK2 β hingegen fluktuierte. Offensichtlich wird die CK2-Expression und Aktivität in den hMSC also anders reguliert als in den 3T3-L1. Ein Grund dafür könnte die Determination sein, die die hMSC zunächst durchlaufen müssen, bevor sie differenzieren [23]. Würde die CK2 dabei stören, müsste sie herunterreguliert werden. Die hMSC benötigen zudem im Gegensatz zu den 3T3-L1 keine MCE [139]. Die CK2 könnte aufgrund ihrer proliferationsfördernden Wirkung positiv auf die MCE der 3T3-L1 wirken. Die beobachtete erhöhte Expression und Aktivität wäre dabei von Vorteil. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Hemmung der CK2 die Proliferation der 3T3-L1 Zellen während der MCE reduziert und ebenso, dass der Einfluss der CK2 innerhalb der ersten 48 bis 72 h essentiell ist, später jedoch nicht mehr. Eine Reduktion der CK2-Aktivität nach der MCE ist vermutlich ebenso wichtig, da sich Proliferation und Differenzierung gegenseitig ausschließen [219]. Wenn die hMSC also nach Induktion der Differenzierung nicht mehr proliferieren, ist es sinnvoll die Kinaseaktivität der CK2 direkt zu drosseln.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von CK2 β in den hMSC zeigte interessanterweise eine Veränderung der Lokalisation zwischen Cytoplasma und Zellkern, während CK2 α hauptsächlich nukleär lokalisiert vorlag. Filhol *et al.* konnten 2002 anhand von GFP-CK2-Fusionsproteinen zeigen, dass CK2 α und β unabhängig voneinander in den Kern importiert werden [220]. Zudem konnten sie mittels Zellfusion beobachten, dass CK2 α sich mit Hilfe des Exportrezeptors CRM-1 frei zwischen Cytoplasma und Kern bewegte, wohingegen CK2 β den Kern nicht verließ. Sollte sich CK2 β in den hMSC ebenso verhalten, kann man davon ausgehen, dass die Zunahme von CK2 β im Kern bis Tag 9 der Differenzierung durch ein "shuttling" vom Cytoplasma in den Kern bedingt ist, die Zunahme im Cytoplasma zu späteren Zeitpunkten jedoch auf eine Neusynthese von CK2 β zurückgeht. Dies würde vermutlich auch die schwankende Expression im Gesamtextrakt erklären. Bislang konnten für die CK2 keine genauen Regulationsmechanismen festgestellt werden. Deshalb postulierten Olsten und Litchfield 2005 die Hypothese, dass nicht die CK2 als Ganzes, sondern ihre Subpopulationen, zum Beispiel getrennt durch ihre subzelluläre Lokalisation, lokal reguliert werden [75]. Eine physiologische Bedeutung des "shuttlings" von CK2 β vom Cytoplasma zu CK2 α in den Kern könnte demnach die Erhöhung der Menge an Holoenzym im Zellkern sein, wodurch dort vermehrt Substrate des Holoenzym phosphoryliert werden könnten. Es gibt zwar einige Substrate, die auch von den monomeren katalytischen Untereinheiten phosphoryliert werden können, die Mehrheit benötigt jedoch das Holoenzym [142]. Zu den Proteinen, die nur vom Holoenzym phosphoryliert werden können und das während der Differenzierung im Kern lokalisiert ist, gehört auch C/EBP δ . Ich konnte außerdem nachweisen, dass die CK2 an

C/EBP δ bindet. Es blieb jedoch offen, ob es sich dabei "nur" um eine Enzym-Substrat-Interaktion handelt. Eine davon unabhängige Bindung birgt die Möglichkeit weiterer Funktionen. So wäre es zum Beispiel möglich, dass C/EBP δ als Adapter die CK2-Untereinheiten in den Kern transportieren könnte, wie es bereits für das DNA-Reparaturprotein FANCD2 gezeigt werden konnte [221]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Rekrutierung der CK2 an den Transaktivatorkomplex von C/EBP δ [222], wodurch sie weitere Substrate innerhalb des Komplexes phosphorylieren könnte. Auch einige Dimerisierungspartner von C/EBP δ , die ebenfalls CK2-Substrate sind, wie z. B. CHOP [223] oder ATF4 [160], könnten so einfacher phosphoryliert werden.

Durch die Hemmung der Kinaseaktivität der CK2 konnte in beiden Zelltypen die Differenzierung zu Adipozyten verhindert werden. In 3T3-L1 Zellen zeigten sowohl Quinalizarin als auch CX-4945 eine Hemmung der Differenzierung, wohingegen in hMSC nur Quinalizarin effektiv war. Durch die Bestimmung der Kinaseaktivität nach Hemmung konnte festgestellt werden, dass CX-4945 bereits 48 h nach Differenzierungsbeginn seine Hemmeffizienz verlor (Restaktivität 70%) und die Zellen dadurch zwar verzögert in die Differenzierung starteten, nach 21 Tagen jedoch im vergleichbaren Umfang differenziert waren wie die DMSO-Kontrolle. Die Tatsache, dass proliferierende hMSC effizient durch CX-4945 gehemmt werden können, schließt die fehlende Aufnahme in die Zelle als Ursache für diese Beobachtung aus. Wahrscheinlicher ist, dass das aufgenommene CX-4945 in den differenzierenden Zellen durch einen Mechanismus unschädlich gemacht wird. Denkbar wäre das Ausschleusen des Hemmstoffes über sogenannte Multi Drug Resistance (MDR) Transporter. Diese Transporter sind dadurch bekannt, dass viele Tumore des Menschen durch ihre Überexpression unempfindlich gegenüber Chemotherapie werden [224]. Im Fall der hMSC hat die Ineffizienz jedoch vermutlich nichts mit diesen Transportern zu tun, denn zum einen konnte in MDR-1/P-Glycoprotein-positiven Tumorzelllinien eine effiziente CK2-Hemmung durch CX-4945 bestätigt werden [225] und zum anderen sind MDR Transporter zwar in embryonalen Stammzellen zum Schutz des Embryos vor Xenobiotika vorhanden und konnten auch beim Erwachsenen in manchen Stammzellen nachgewiesen werden, jedoch bislang nicht in MSC [226-228]. Über die Ursache des Versagens kann also nur spekuliert werden. Aus den Ergebnissen lässt sich jedoch eindeutig ableiten, dass eine gewisse Aktivität der CK2 für eine erfolgreiche Differenzierung der hMSC zu Adipozyten vorhanden sein muss.

Nachdem die CK2 nun während der Differenzierung näher charakterisiert wurde und es deutlich wurde, dass ihre Hemmung die Adipogenese verhindert, lag die Konzentration auf

der Ermittlung ihres Angriffspunktes innerhalb der adipogenen Signalkaskade. Dieser konnte in Vorarbeiten von Frau Dr. Kostelnik und Herr Dr. Zimmer in 3T3-L1 Zellen bereits näher eingegrenzt werden [148, 153]. Der Adipogenese-Signalweg läuft demnach bis zur Expression von C/EBP β und C/EBP δ auch im gehemmten Zustand normal ab. Allerdings kommt es bei Hemmung nicht zur Expression von PPAR γ 2, was die Erklärung für die ausbleibende Differenzierung liefert, da es sich dabei um den Masterregulator der Adipogenese handelt [35, 36]. Zudem konnte ich zeigen, dass auch die Expression des ebenfalls sehr wichtigen C/EBP α bei CK2-Hemmung stark reduziert ist. Die Expression von C/EBP α und PPAR γ 2 wird zwar durch viele Faktoren beeinflusst, jedoch hauptsächlich von den Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP δ initiiert [44, 229]. Die C/EBPs dimerisieren dabei über ihre basische Leucin-Zipper (bZIP) Domäne zu Homo- oder Heterodimeren und sind nur in dieser Form in der Lage, ihre Ziel-DNA zu binden und die Genexpression zu induzieren oder zu hemmen [32, 33]. Der Promotorbereich von PPAR γ 2 enthält zwei CCAAT-Boxen, die als Bindestellen für die C/EBP-Transkriptionsfaktoren dienen [230, 231]. Demzufolge war die erste Idee, dass diese beiden Faktoren oder einer davon durch die Hemmung der CK2 die Transaktivierung nicht mehr ausüben können. Durch eine *in silico*-Analyse identifizierte Herr Dr. Zimmer C/EBP δ als potentiell CK2 Substrat und konnte die Phosphorylierung *in vitro* nachweisen [153]. Neben C/EBP δ sind viele weitere Transkriptionsfaktoren Substrate der CK2, so z. B. ATF4 [160], CHOP [223], Foxc2 [232], USF1 [161] und Pdx-1 [233]. Die Phosphorylierung hat dabei die unterschiedlichsten Effekte. So kann sie die subzelluläre Lokalisation regulieren (Foxc2), die Dimerisierung mit anderen Proteinen beeinflussen (USF1), die DNA-Bindung verändern (USF1 [234]) oder die Transaktivierungsfähigkeit regulieren (ATF4, CHOP, USF1, Pdx-1). Nach Ermittlung der CK2-Hauptphosphorylierungsstelle in C/EBP δ [154], untersuchte ich deshalb die biologische Funktion der Phosphorylierung. Die Phosphorylierung an S57 beeinflusste weder die subzelluläre Lokalisation, noch die Fähigkeit mit C/EBP β zu dimerisieren oder die DNA-Bindfähigkeit von C/EBP δ an den PPAR γ 2-Promotor. Auch die DNA-Bindung von C/EBP β an diesen Promotor war nach Hemmung der CK2 unverändert. Die Lokalisation der CK2-Phosphorylierungsstelle in der Transaktivierungsdomäne von C/EBP δ ließ schon die Vermutung zu, dass die Phosphorylierung etwas an der Transaktivierungsfähigkeit verändern könnte. So wunderte es nicht, dass ich mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays zeigen konnte, dass die Phosphorylierung von C/EBP δ durch die CK2 die Transaktivierung des PPAR γ 2-Promotors erhöht. Die Beteiligung der CK2 konnte eindeutig belegt werden, indem die Cotransfektion von CK2 α und β zusammen mit C/EBP δ die Transaktivierung noch

verstärkte. Im Umkehrschluss müsste die Transaktivierung bei Hemmung der CK2 reduziert sein, was durch die Verwendung einer Alanin-Phosphomutante von C/EBP δ bestätigt werden konnte. Zudem wäre eine verringerte Transaktivierung des Promotors durch die fehlende Phosphorylierung von C/EBP δ die einfachste Erklärung der ausbleibenden Expression von PPAR γ 2 im gehemmten Zustand. Dies konnte in den 3T3-L1 Zellen jedoch nicht bestätigt werden. Die Transaktivierung des PPAR γ 2 Promotors war in gehemmten Zellen sogar noch stärker als in den Kontrollzellen. Die Regulation der Transaktivierungsfähigkeit von C/EBP δ durch die CK2 spielt demnach offensichtlich während der adipogenen Differenzierung eine untergeordnete Rolle. Es stellte sich also die Frage, wieso PPAR γ 2 nach CK2-Hemmung trotz verstärkter Aktivierung seines Promotors nicht exprimiert wird. Denkbar wären zwei Regulationswege: die Beeinflussung der mRNA auf posttranskriptioneller Ebene und die Beeinflussung der Translation. Tatsächlich gehören viele Proteine im Bereich der Translation zu den Substraten der CK2. Dazu zählen die eukaryonten Translationsinitiationsfaktoren eIF2 β , 3, 4B und 5 sowie der Translationsregulator PHAS-I [78]. Da jedoch bereits die mRNA von PPAR γ 2 in den gehemmten Zellen stark reduziert ist, muss der Effekt auf posttranskriptioneller Ebene liegen und hat vermutlich nichts mit einer reduzierten Translation der mRNA zu tun. Die Entdeckung der miRNAs bzw. der experimentelle Fortschritt ihrer Analyse hat das Verständnis der posttranskriptionellen Regulation erheblich erweitert. Die 20-24 Nukleotide langen miRNAs induzieren die Degradation oder hemmen die Translation spezifischer mRNAs durch Bindung (Basenpaarung) an deren 3'- oder seltener 5'-UTRs [50]. Eine perfekte Komplementarität kommt dabei selten vor; bei einer partiellen Komplementarität spielt die Bindung der sogenannten "seed"-Sequenz eine besonders wichtige Rolle. Diese ist 6-8 Nukleotide lang und meist evolutionär stark konserviert [235, 236]. Die Prozessierung der miRNA verläuft über die Stufen pri-miRNA, pre-miRNA und ds-miRNA bis zur reifen einzelsträngigen miRNA, die als Komplex mit dem "RNA induced silencing complex" (RISC) an die mRNA bindet [50]. Der RISC-Komplex bindet dabei nur einen Strang der ds-miRNA. Der gebundene Strang wird als dominanter Strang (miRNA) bezeichnet, der andere Strang (miRNA*) wird im Allgemeinen abgebaut, wobei auch miRNAs bekannt sind, bei denen beide Stränge in den RISC-Komplex aufgenommen werden [237]. Eine miRNA besitzt in der Regel mehrere Ziel-mRNAs und nimmt so großen Einfluss auf die Feinjustierung der zellulären Proteinausstattung [238]. Es werden zunehmend miRNAs entdeckt, die wichtige Rollen bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen spielen [51, 52]. Auch für die Adipogenese wurden bereits zahlreiche regulatorische miRNAs beschrieben [53]. In dieser Arbeit wurden vier miRNAs

untersucht, für die bereits zuvor nachgewiesen wurde, dass eines ihrer Ziele die PPAR γ 2-mRNA ist. Bei ihnen handelt es sich um miR-27a [162, 164], miR-27b [162, 163], miR-130a und miR-130b [165]. Die Recherche auf mirbase.org, einer miRNA Datenbank [239], ergab, dass bei ihnen allen der 3p-Strang der dominante Strang ist, dieser also in den RISC-Komplex aufgenommen wird. Die miRNA-Primer zur Generierung der Hybridisierungssonden wurden dementsprechend ausgewählt. Für alle oben genannten miRNAs konnte nachgewiesen werden, dass sie während der Adipogenese herunterreguliert werden [162-165]. Dies steht im Einklang mit ihrer Funktion, die Expression von PPAR γ 2 erst nach Induktion der Differenzierung zuzulassen. In dieser Arbeit konnte die Herunterregulation im Kontrollansatz jedoch nur bei miR-27a und miR-130b bestätigt werden. Die Expression von miR-27b schwankte um den Anfangswert und miR-130a nahm sogar leicht zu. Warum die Ergebnisse von denen in der Literatur abweichen, ist schwer zu erklären. Alle Autoren untersuchten die miRNAs neben anderen Zellsystemen auch in 3T3-L1, die Zellen wurden jedoch zum Teil unter anderen Bedingungen differenziert. Als Analysemethode wurde in der Literatur mit Ausnahme von miR-27a die Bestimmung der Expression mittels qRT-PCR gewählt. Ich wies alle miRNAs im Northern Blot mittels radioaktiv markierter Sonde nach. Bei beiden Methoden wird jedoch eine interne Ladekontrolle verwendet auf die die Ergebnisse normiert werden, deshalb sollte es keine großen Unterschiede zwischen ihnen geben. Ohne weiterführende Untersuchungen können die Unterschiede wohl nicht erklärt werden. Unabhängig davon ist es jedoch sehr interessant, dass die miRNA-Expression mit wenigen Ausnahmen in den gehemmten Zellen höher waren als bei der Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die CK2 einen Einfluss auf das miRNA-System besitzen könnte. Unterstützt wird diese These durch den Bericht von Li *et al.*, wonach nach Hemmung der CK2 mit TBB in MCF-7 Brustkrebszellen einige miRNAs erhöht oder erniedrigt vorlagen, darunter auch hsa-miR-27a und -27b [240]. Die beiden miRNAs zeigten jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit ein gegensätzliches Verhalten. Das ubiquitäre Vorkommen der CK2 in der Zelle ermöglicht es ihr theoretisch, bei jedem Prozessierungsschritt einzugreifen. Da jedoch viele Transkriptionsfaktoren Substrate der CK2 sind, wäre es gut möglich, dass sie bereits bei der Induktion der Transkription von miRNAs beteiligt ist. So bindet und phosphoryliert die CK2 das Tumorsuppressorprotein p53 [241, 242, 243], das wiederum als Aktivator der Transkription der miR34-Familie beschrieben wurde [244]. Es ist ebenfalls gut möglich, dass die CK2 bei mehreren Schritten während der Prozessierung eingreift. So könnte sie auch durch Phosphorylierung die Aktivität einer der vielzähligen Prozessierungsmaschinen (Drosha, Dicer, RISC) regulieren. Kürzlich konnten Alessi *et al.* eine Beteiligung der CK2 am

miRISC-Komplex in *C. elegans* nachweisen. Die CK2 ist demnach notwendig für die Bindung des miRISC-Komplexes an die Ziel-mRNA und deren Stilllegung. Die DEAD-Box RNA-Helikase CGH-1/DDX6, die an der Stilllegung beteiligt ist, konnte als Substrat identifiziert werden [245]. Da noch nicht viel über die Beteiligung der CK2 am miRNA-System bekannt ist, tut sich damit ein großes neues Forschungsgebiet im CK2-Feld auf. Im Hinblick auf die Adipogenese der 3T3-L1 Zellen ist die Entdeckung, dass nach CK2-Hemmung die PPAR γ 2-spezifischen miRNAs erhöht sind, der Beginn einer Erklärung weshalb die Expression ausbleibt. Da die beobachteten Effekte jedoch nicht so stark ausgeprägt sind wie erwartet, muss die CK2 noch weitere, in dieser Arbeit nicht entdeckte, Angriffspunkte besitzen. Denkbar wären Einflüsse auf die anderen posttranskriptionellen Regulationszweige wie die Prozessierung der mRNA oder das Spleißen.

Auch in C3H/10T1/2 Zellen verläuft die Hemmung der Adipogenese nach CK2-Hemmung über die stark reduzierte Expression von PPAR γ 2 [246], weshalb die Vermutung nahe liegt, dass es sich dabei um einen generellen Mechanismus handeln könnte. Die Untersuchung von PPAR γ 2 in den hMSC zeigte jedoch ein anderes Bild. Dort wurde auch im gehemmten Zustand PPAR γ 2 exprimiert, dieses verlor jedoch bei der erfolgreichen Hemmung mit Q größtenteils seine nukleäre Lokalisation, was wahrscheinlich dazu führte, dass es seine Transkriptionsfaktorfunktion nicht mehr ausüben konnte. Die mit CX-4945 gehemmten hMSC zeigten eine deutliche Kernfluoreszenz, jedoch war der Anteil an PPAR γ 2 im Cytoplasma im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Da die mit CX-4945 erzielte Hemmung zwar nicht ausreichte, um die Differenzierung zu verhindern, die CK2-Aktivität jedoch immer noch um etwa 30% verringert war, wäre es denkbar, dass die erhöhte cytoplasmatische Lokalisation auf die reduzierte Kinaseaktivität zurückzuführen ist. Trotzdem war die im Kern befindliche Menge an PPAR γ 2 offensichtlich ausreichend, um eine Differenzierung zu induzieren. Es ist allgemein bekannt, dass Phosphorylierungen die subzelluläre Lokalisation beeinflussen können. Auch in Bezug auf die CK2 wurden bereits Transkriptionsfaktoren beschrieben, deren Lokalisation im Zellkern von der CK2-Phosphorylierung abhängt, darunter cdc25C, PPAR γ 1 und Foxc2 [247, 248, 232]. Dabei wirkt sich die Phosphorylierung bei allen hemmend auf die Kernlokalisation aus. Bei cdc25C geht die cytoplasmatische Lokalisation auf einen fehlerhaften Kernimport zurück, bei PPAR γ 1 auf einen erhöhten Kernexport und bei Foxc2 wurde der Mechanismus nicht untersucht. Die bei PPAR γ 1 phosphorylierten Aminosäuren S16 und S21 (murine Form) kommen auch in PPAR γ 2 vor, das N-terminal 30 Aminosäuren mehr besitzt (dort also S46 und S51), und sind im Menschen konserviert. Eine *in silico* Analyse zeigt, dass das murine PPAR γ 2 zusätzlich dazu drei weitere putative CK2-

Phosphorylierungsstellen (S8, T25 und T30) im N-Terminus enthält. Beim Menschen sind es ebenfalls drei (S8, S16 und T30), wobei bei beiden Spezies nur S8 100% gleich ist. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren könnte eine zusätzliche Regulation bewirken, sodass im hyperphosphorylierten Zustand der Kernverbleib und nicht der bei PPAR γ 1 beobachtete Kernexport favorisiert wird. Eine unterschiedliche Regulation würde auch Sinn machen, da die beiden Isoformen im Körper unterschiedliche Aufgaben übernehmen. PPAR γ 1 wird in vielen Geweben exprimiert, wohingegen PPAR γ 2 unter normalen physiologischen Bedingungen ausschließlich im Fettgewebe vorkommt [249, 250].

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Zellsysteme 3T3-L1 und hMSC, erkennt man, dass sie sich nicht nur im Verhalten der CK2 bezüglich Expression, Aktivität und subzelluläre Lokalisation während der Differenzierung, sondern auch in Hinsicht auf PPAR γ 2 unterschiedlich verhalten. Das Ergebnis ist jedoch dasselbe, nämlich die Einflussnahme der CK2 auf PPAR γ 2; in 3T3-L1 durch Regulation der Expression, in hMSC durch Regulation der subzellulären Lokalisation. Auch wenn die CK2 in den beiden Systemen vermutlich zum Teil unterschiedliche Angriffspunkte besitzt, lassen sich also in gewisser Weise doch Gemeinsamkeiten feststellen, die allgemein gültig sind. Somit können Erkenntnisse, die in 3T3-L1 erzielt wurden, zumindest eine Idee des beteiligten Mechanismus und somit Ansatzpunkte für die Untersuchung in menschlichen Zellen liefern. In dieser Hinsicht wäre es in hMSC interessant, eine Beteiligung der CK2 an der Regulation des miRNA-Systems zu untersuchen, wobei dies für die Regulation von PPAR γ 2 dort keine Rolle spielen dürfte.

Durch die Analyse der Proteinkinase CK2 bei der neuronalen und adipogenen Differenzierung konnte das Verständnis ihrer Rolle bei Differenzierungsprozessen verbessert werden. Die Untersuchungen führten zu der Feststellung, dass die CK2 nicht nur während der embryonalen Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus noch essentiell für Differenzierungsvorgänge ist. Den Haupteinfluss scheint sie dabei zu Beginn der Differenzierung auszuüben, was eine Beteiligung an der Induktion der Differenzierung nahe legt. Da die CK2 sehr viele verschiedene Substrate besitzt, greift sie meist auf mehreren Wegen in einen zellulären Prozess ein und dementsprechend komplex ist die Analyse ihrer Beteiligung. Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Differenzierungssystemen zu finden ist schwierig, da die Signalkaskaden der neuronalen, astrozytären und adipogenen Differenzierung unterschiedlich sind. Zudem wurden die Zellsysteme auf unterschiedlicher experimenteller Tiefe untersucht. Abb. 39 fasst die identifizierten und potentiellen Angriffspunkte der CK2 bei der Differenzierung der untersuchten Zellsysteme zusammen.

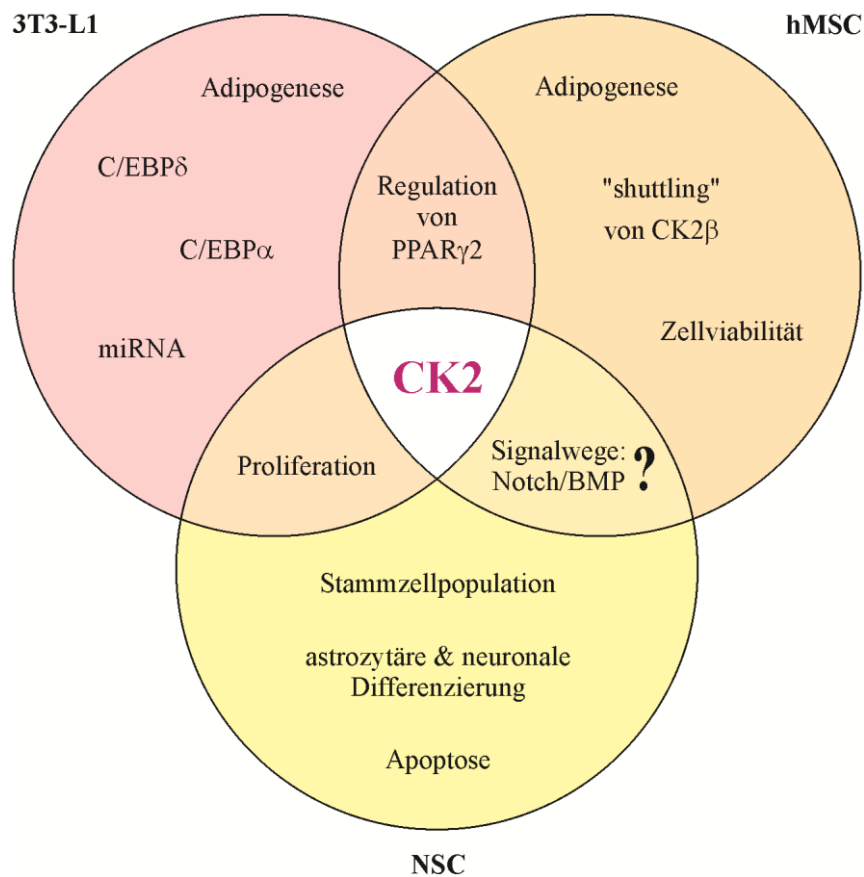


Abbildung 39: Zusammenfassung der Angriffspunkte der CK2 in den untersuchten Differenzierungsmodellen. In den äußeren Bereichen sind die zelltyp-spezifischen Angriffspunkte der CK2 abgebildet. In den Überschneidungsbereichen sind Prozesse dargestellt, die in den beiden beteiligten Zellsystemen durch die CK2 beeinflusst werden. Potentielle Gemeinsamkeiten sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Aktuell wird die CK2 als Zielprotein der Tumorthherapie untersucht. Mehrere Hemmstoffe befinden sich in klinischen Testphasen. Auch Erkenntnisse über die Differenzierung können zu neuen Therapien führen. So könnte eine Hemmung der CK2 zum Beispiel die Differenzierung neuer Fettzellen bei Menschen mit beginnender Adipositas verhindern und somit dazu führen, dass sich das Krankheitsbild nicht verschlimmert, indem Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen auftreten. Die Analyse des Wirkmechanismus kann dabei die Spezifität erhöhen, sodass möglichst nur die Zielzellen beeinflusst werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. (2007) *Principles of Development: Das Original mit Übersetzungshilfen*, 3rd ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 15
2. Kempermann, G. (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis, *J Neurosci* 22, 635-638.
3. Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone, *J Neurosci* 22, 629-634.
4. Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., Wojtowicz, J. M. (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory, *Neuroscience* 130, 843-852.
5. Garthe, A., Roeder, I., Kempermann, G. (2016) Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis, *Hippocampus* 26, 261-271.
6. Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3168-3171.
7. Jacobs, B. L., van Praag, H., Gage, F. H. (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression, *Mol Psychiatry* 5, 262-269.
8. Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain, *Science* 264, 1145-1148.
9. Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A. (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14895-14900.
10. Gotz, M., Huttner, W. B. (2005) The cell biology of neurogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.
11. Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., Heintz, N. (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system, *Neuron* 41, 881-890.
12. Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A. R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases, *Nat Neurosci* 7, 136-144.
13. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain, *J Neurosci* 17, 5046-5061.
14. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Cell* 97, 703-716.
15. Alvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F. (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain, *Brain Res Bull* 57, 751-758.

16. Merkle, F. T., Alvarez-Buylla, A. (2006) Neural stem cells in mammalian development, *Curr Opin Cell Biol* 18, 704-709.
17. Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., Gage, F. H. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain, *J Neurosci* 17, 5820-5829.
18. Chen, K., Henry, R. A., Hughes, S. M., Connor, B. (2007) Creating a neurogenic environment: the role of BDNF and FGF2, *Mol Cell Neurosci* 36, 108-120.
19. Vilar, M., Mira, H. (2016) Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles, *Front Neurosci* 10, 26.
20. Ahmed, S., Gan, H. T., Lam, C. S., Poonepalli, A., Ramasamy, S., Tay, Y., Tham, M., Yu, Y. H. (2009) Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation, *Cell Adh Migr* 3, 412-424.
21. Gil-Perotin, S., Duran-Moreno, M., Cebrian-Silla, A., Ramirez, M., Garcia-Belda, P., Garcia-Verdugo, J. M. (2013) Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay, *Anat Rec (Hoboken)* 296, 1435-1452.
22. Zhang, J., Jiao, J. (2015) Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis, *Biomed Res Int* 2015, 727542.
23. Tang, Q. Q., Lane, M. D. (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte, *Annu Rev Biochem* 81, 715-736.
24. Todaro, G. J., Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J Cell Biol* 17, 299-313.
25. Green, H., Kehinde, O. (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid, *Cell* 1, 113-116.
26. Green, H., Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture, *Cell* 3, 127-133.
27. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells* 25, 2739-2749.
28. Fajas, L. (2003) Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation, *Ann Med* 35, 79-85.
29. Tang, Q. Q., Otto, T. C., Lane, M. D. (2003) Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 44-49.
30. Newman, J. R., Keating, A. E. (2003) Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays, *Science* 300, 2097-2101.
31. Vinson, C., Acharya, A., Taparowsky, E. J. (2006) Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo, *Biochim Biophys Acta* 1759, 4-12.

32. Hattori, T., Ohoka, N., Inoue, Y., Hayashi, H., Onozaki, K. (2003) C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer, *Oncogene* 22, 1273-1280.
33. Vinson, C. R., Sigler, P. B., McKnight, S. L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins, *Science* 246, 911-916.
34. Ron, D., Habener, J. F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription, *Genes Dev* 6, 439-453.
35. Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell* 79, 1147-1156.
36. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., Mortensen, R. M. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro, *Mol Cell* 4, 611-617.
37. Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P., Camp, H. S. (2002) PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis, *Genes Dev* 16, 27-32.
38. Klemm, D. J., Roesler, W. J., Boras, T., Colton, L. A., Felder, K., Reusch, J. E. (1998) Insulin stimulates cAMP-response element binding protein activity in HepG2 and 3T3-L1 cell lines, *J Biol Chem* 273, 917-923.
39. Belmonte, N., Phillips, B. W., Massiera, F., Villageois, P., Wdziekonski, B., Saint-Marc, P., Nichols, J., Aubert, J., Saeki, K., Yuo, A., Narumiya, S., Ailhaud, G., Dani, C. (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and -delta in preadipocytes, *Mol Endocrinol* 15, 2037-2049.
40. Tang, Q. Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J. W., Otto, T. C., Pandey, A., Lane, M. D. (2005) Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9766-9771.
41. Reusch, J. E., Hsieh, P., Klemm, D., Hoeffler, J., Draznin, B. (1994) Insulin inhibits dephosphorylation of adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein/activating transcription factor-1: effect on nuclear phosphoserine phosphatase-2a, *Endocrinology* 135, 2418-2422.
42. Reusch, J. E., Hsieh, P., Bhuripanyo, P., Carel, K., Leitner, J. W., Olefsky, J. M., Draznin, B. (1995) Insulin inhibits nuclear phosphatase activity: requirement for the C-terminal domain of the insulin receptor, *Endocrinology* 136, 2464-2469.
43. Tang, Q. Q., Lane, M. D. (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12446-12450.

44. Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J., Spiegelman, B. M. (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol Cell* 3, 151-158.
45. Wang, L., Xu, S., Lee, J. E., Baldrige, A., Grullon, S., Peng, W., Ge, K. (2013) Histone H3K9 methyltransferase G9a represses PPARgamma expression and adipogenesis, *Embo J* 32, 45-59.
46. Li, S. F., Guo, L., Qian, S. W., Liu, Y., Zhang, Y. Y., Zhang, Z. C., Zhao, Y., Shou, J. Y., Tang, Q. Q., Li, X. (2013) G9a is transactivated by C/EBPbeta to facilitate mitotic clonal expansion during 3T3-L1 preadipocyte differentiation, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E990-998.
47. Umek, R. M., Friedman, A. D., McKnight, S. L. (1991) CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch, *Science* 251, 288-292.
48. Tao, H., Umek, R. M. (2000) C/EBPalpha is required to maintain postmitotic growth arrest in adipocytes, *DNA Cell Biol* 19, 9-18.
49. Madsen, M. S., Siersbaek, R., Boergesen, M., Nielsen, R., Mandrup, S. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading, *Mol Cell Biol* 34, 939-954.
50. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat Cell Biol* 11, 228-234.
51. Wienholds, E., Plasterk, R. H. (2005) MicroRNA function in animal development, *FEBS Lett* 579, 5911-5922.
52. Lee, C. T., Risom, T., Strauss, W. M. (2006) MicroRNAs in mammalian development, *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 129-139.
53. Price, N. L., Fernandez-Hernando, C. (2016) miRNA regulation of white and brown adipose tissue differentiation and function, *Biochim Biophys Acta* 1861, 2104-2110
54. Burnett, G., Kennedy, E. P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins, *J Biol Chem* 211, 969-980.
55. Meisner, H., Heller-Harrison, R., Buxton, J., Czech, M. P. (1989) Molecular cloning of the human casein kinase II alpha subunit, *Biochemistry* 28, 4072-4076.
56. Antonelli, M., Daniotti, J. L., Rojo, D., Allende, C. C., Allende, J. E. (1996) Cloning, expression and properties of the alpha' subunit of casein kinase 2 from zebrafish (*Danio rerio*), *Eur J Biochem* 241, 272-279.
57. Heller-Harrison, R. A., Meisner, H., Czech, M. P. (1989) Cloning and characterization of a cDNA encoding the beta subunit of human casein kinase II, *Biochemistry* 28, 9053-9058.

58. Voss, H., Wirkner, U., Jakobi, R., Hewitt, N. A., Schwager, C., Zimmermann, J., Ansorge, W., Pyerin, W. (1991) Structure of the gene encoding human casein kinase II subunit beta, *J Biol Chem* 266, 13706-13711.
59. Dotan, I., Ziv, E., Dafni, N., Beckman, J. S., McCann, R. O., Glover, C. V., Canaani, D. (2001) Functional conservation between the human, nematode, and yeast CK2 cell cycle genes, *Biochem Biophys Res Commun* 288, 603-609.
60. Stigare, J., Buddelmeijer, N., Pigon, A., Egyhazi, E. (1993) A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit, *Mol Cell Biochem* 129, 77-85.
61. Heriche, J. K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M., Goldberg, Y. (1997) Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha, *Science* 276, 952-955.
62. Romero-Oliva, F., Jacob, G., Allende, J. E. (2003) Dual effect of lysine-rich polypeptides on the activity of protein kinase CK2, *J Cell Biochem* 89, 348-355.
63. Lee, N. Y., Haney, J. C., Sogani, J., Blobe, G. C. (2009) Casein kinase 2beta as a novel enhancer of activin-like receptor-1 signaling, *Faseb J* 23, 3712-3721.
64. Mannowetz, N., Kartarius, S., Wennemuth, G., Montenarh, M. (2010) Protein kinase CK2 and new binding partners during spermatogenesis, *Cell Mol Life Sci* 67, 3905-3913.
65. Kusk, M., Bendixen, C., Duno, M., Westergaard, O., Thomsen, B. (1995) Genetic dissection of intersubunit contacts within human protein kinase CK2, *J Mol Biol* 253, 703-711.
66. Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L. A., Issinger, O. G. (1992) Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme, *Eur J Biochem* 204, 293-297.
67. Marin, O., Meggio, F., Pinna, L. A. (1999) Structural features underlying the unusual mode of calmodulin phosphorylation by protein kinase CK2: A study with synthetic calmodulin fragments, *Biochem Biophys Res Commun* 256, 442-446.
68. Hanks, S. K., Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *Faseb J* 9, 576-596.
69. Lozeman, F. J., Litchfield, D. W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K. A., Krebs, E. G. (1990) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II, *Biochemistry* 29, 8436-8447.
70. Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D., Seldin, D. C. (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit, *Nat Genet* 23, 118-121.
71. Vilks, G., Saulnier, R. B., St Pierre, R., Litchfield, D. W. (1999) Inducible expression of protein kinase CK2 in mammalian cells. Evidence for functional specialization of CK2 isoforms, *J Biol Chem* 274, 14406-14414.

72. Turowec, J. P., Vilks, G., Gabriel, M., Litchfield, D. W. (2013) Characterizing the convergence of protein kinase CK2 and caspase-3 reveals isoform-specific phosphorylation of caspase-3 by CK2alpha': implications for pathological roles of CK2 in promoting cancer cell survival, *Oncotarget* 4, 560-571.
73. Allende, J. E., Allende, C. C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation, *Faseb J* 9, 313-323.
74. Niefind, K., Yde, C. W., Ermakova, I., Issinger, O. G. (2007) Evolved to be active: sulfate ions define substrate recognition sites of CK2alpha and emphasise its exceptional role within the CMGC family of eukaryotic protein kinases, *J Mol Biol* 370, 427-438.
75. Olsten, M. E., Litchfield, D. W. (2004) Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2, *Biochem Cell Biol* 82, 681-693.
76. Lolli, G., Pinna, L. A., Battistutta, R. (2012) Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization, *ACS Chem Biol* 7, 1158-1163.
77. Marin, O., Meggio, F., Draetta, G., Pinna, L. A. (1992) The consensus sequences for cdc2 kinase and for casein kinase-2 are mutually incompatible. A study with peptides derived from the beta-subunit of casein kinase-2, *FEBS Lett* 301, 111-114.
78. Meggio, F., Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?, *Faseb J* 17, 349-368.
79. St-Denis, N., Gabriel, M., Turowec, J. P., Gloor, G. B., Li, S. S., Gingras, A. C., Litchfield, D. W. (2015) Systematic investigation of hierarchical phosphorylation by protein kinase CK2, *J Proteomics* 118, 49-62.
80. Wilson, L. K., Dhillon, N., Thorner, J., Martin, G. S. (1997) Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3, *J Biol Chem* 272, 12961-12967.
81. Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H., Pinna, L. A. (2009) Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis, *Biochim Biophys Acta* 1793, 847-859.
82. Bian, Y., Ye, M., Wang, C., Cheng, K., Song, C., Dong, M., Pan, Y., Qin, H., Zou, H. (2013) Global screening of CK2 kinase substrates by an integrated phosphoproteomics workflow, *Sci Rep* 3, 3460.
83. Glover, C. V., 3rd. (1998) On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59, 95-133.
84. Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W., Pyerin, W. (1994) Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle, *J Biol Chem* 269, 6986-6991.
85. Ahmad, K. A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., Ahmed, K. (2008) Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis, *Adv Enzyme Regul* 48, 179-187.

86. Dessauge, F., Lizundia, R., Langsley, G. (2005) Constitutively activated CK2 potentially plays a pivotal role in Theileria-induced lymphocyte transformation, *Parasitology* 130, 37-44.
87. Daya-Makin, M., Sanghera, J. S., Mogentale, T. L., Lipp, M., Parchomchuk, J., Hogg, J. C., Pelech, S. L. (1994) Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung, *Cancer Res* 54, 2262-2268.
88. Stalter, G., Siemer, S., Becht, E., Ziegler, M., Remberger, K., Issinger, O. G. (1994) Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors, *Biochem Biophys Res Commun* 202, 141-147.
89. Landesman-Bollag, E., Romieu-Mourez, R., Song, D. H., Sonenshein, G. E., Cardiff, R. D., Seldin, D. C. (2001) Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis, *Oncogene* 20, 3247-3257.
90. Unger, G. M., Davis, A. T., Slaton, J. W., Ahmed, K. (2004) Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets* 4, 77-84.
91. Laramas, M., Pasquier, D., Filhol, O., Ringeisen, F., Descotes, J. L., Cochet, C. (2007) Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer, *Eur J Cancer* 43, 928-934.
92. Schneider, H. R., Reichert, G. H., Issinger, O. G. (1986) Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis. Identification of a 110-kDa phosphoprotein as the major phosphorylation product in mouse embryos and Krebs II mouse ascites tumor cells, *Eur J Biochem* 161, 733-738.
93. Hu, E., Rubin, C. S. (1990) Casein kinase II from *Caenorhabditis elegans*. Properties and developmental regulation of the enzyme; cloning and sequence analyses of cDNA and the gene for the catalytic subunit, *J Biol Chem* 265, 5072-5080.
94. Perez, M., Grande, J., Itarte, E. (1987) Developmental changes in rat hepatic casein kinases 1 and 2, *Eur J Biochem* 170, 493-498.
95. Mestres, P., Boldyreff, B., Ebensperger, C., Hameister, H., Issinger, O. G. (1994) Expression of casein kinase 2 during mouse embryogenesis, *Acta Anat (Basel)* 149, 13-20.
96. Maridor, G., Park, W., Krek, W., Nigg, E. A. (1991) Casein kinase II. cDNA sequences, developmental expression, and tissue distribution of mRNAs for alpha, alpha', and beta subunits of the chicken enzyme, *J Biol Chem* 266, 2362-2368.
97. Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H. H., Pointu, H., Olsen, B. B., Cochet, C., Issinger, O. G., Boldyreff, B. (2003) Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality, *Mol Cell Biol* 23, 908-915.

98. Lou, D. Y., Dominguez, I., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., O'Brien, C., Seldin, D. C. (2008) The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development, *Mol Cell Biol* 28, 131-139.
99. Seldin, D. C., Lou, D. Y., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., Dominguez, I. (2008) Gene targeting of CK2 catalytic subunits, *Mol Cell Biochem* 316, 141-147.
100. Dominguez, I., Degano, I. R., Chea, K., Cha, J., Toselli, P., Seldin, D. C. (2011) CK2alpha is essential for embryonic morphogenesis, *Mol Cell Biochem* 356, 209-216.
101. Escalier, D., Silvius, D., Xu, X. (2003) Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus, *Mol Reprod Dev* 66, 190-201.
102. Landesman-Bollag, E., Belkina, A., Hovey, B., Connors, E., Cox, C., Seldin, D. C. (2011) Developmental and growth defects in mice with combined deficiency of CK2 catalytic genes, *Mol Cell Biochem* 356, 227-231.
103. Huillard, E., Ziercher, L., Blond, O., Wong, M., Deloulme, J. C., Souchelnytskyi, S., Baudier, J., Cochet, C., Buchou, T. (2010) Disruption of CK2beta in embryonic neural stem cells compromises proliferation and oligodendrogenesis in the mouse telencephalon, *Mol Cell Biol* 30, 2737-2749.
104. Ulloa, L., Diaz-Nido, J., Avila, J. (1994) Depletion of catalytic and regulatory subunits of protein kinase CK2 by antisense oligonucleotide treatment of neuroblastoma cells, *Cell Mol Neurobiol* 14, 407-414.
105. Moreno, F. J., Diaz-Nido, J., Jimenez, J. S., Avila, J. (1999) Distribution of CK2, its substrate MAP1B and phosphatases in neuronal cells, *Mol Cell Biochem* 191, 201-205.
106. Winter, B., Kautzner, I., Issinger, O. G., Arnold, H. H. (1997) Two putative protein kinase CK2 phosphorylation sites are important for Myf-5 activity, *Biol Chem* 378, 1445-1456.
107. Iyengar, A. S., Loupe, J. M., Miller, P. J., Hollenbach, A. D. (2012) Identification of CK2 as the kinase that phosphorylates Pax3 at Ser209 in early myogenic differentiation, *Biochem Biophys Res Commun* 428, 24-30.
108. Son, E., Do, H., Joo, H. M., Pyo, S. (2007) Induction of alkaline phosphatase activity by L-ascorbic acid in human osteoblastic cells: a potential role for CK2 and Ikaros, *Nutrition* 23, 745-753.
109. Bragdon, B., Thinakaran, S., Moseychuk, O., King, D., Young, K., Litchfield, D. W., Petersen, N. O., Nohe, A. (2010) Casein kinase 2 beta-subunit is a regulator of bone morphogenetic protein 2 signaling, *Biophys J* 99, 897-904.
110. Bragdon, B., Thinakaran, S., Moseychuk, O., Gurski, L., Bonor, J., Price, C., Wang, L., Beamer, W. G., Nohe, A. (2011) Casein kinase 2 regulates in vivo bone formation through its interaction with bone morphogenetic protein receptor type Ia, *Bone* 49, 944-954.

111. Dovat, S., Song, C., Payne, K. J., Li, Z. (2011) Ikaros, CK2 kinase, and the road to leukemia, *Mol Cell Biochem* 356, 201-207.
112. Cheng, P., Kumar, V., Liu, H., Youn, J. I., Fishman, M., Sherman, S., Gabrilovich, D. (2014) Effects of notch signaling on regulation of myeloid cell differentiation in cancer, *Cancer Res* 74, 141-152.
113. Wilhelm, N., Kostelnik, K., Götz, C., Montenarh, M. (2012) Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes, *Mol Cell Biochem* 365, 37-45.
114. Faust, M., Schuster, N., Montenarh, M. (1999) Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin, *FEBS Lett* 462, 51-56.
115. Schuster, N., Götz, C., Faust, M., Schneider, E., Prowald, A., Jungbluth, A., Montenarh, M. (2001) Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity, *J Cell Biochem* 81, 172-183.
116. Nastainczyk, W., Schmidt-Spaniol, I., Boldyreff, B., Issinger, O. G. (1995) Isolation and characterization of a monoclonal anti-protein kinase CK2 beta-subunit antibody of the IgG class for the direct detection of CK2 beta-subunit in tissue cultures of various mammalian species and human tumors, *Hybridoma* 14, 335-339.
117. Götz, C., Bachmann, C., Montenarh, M. (2007) Inhibition of protein kinase CK2 leads to a modulation of androgen receptor dependent transcription in prostate cancer cells, *Prostate* 67, 125-134.
118. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-580.
119. Schneider, C. C., Hessenauer, A., Götz, C., Montenarh, M. (2009) DMAT, an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks, *Oncol Rep* 21, 1593-1597.
120. Pagano, M. A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzeszko, A., Cozza, G., Meggio, F., Pinna, L. A. (2008) The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update, *Biochem J* 415, 353-365.
121. Cozza, G., Venerando, A., Sarno, S., Pinna, L. A. (2015) The Selectivity of CK2 Inhibitor Quinalizarin: A Reevaluation, *Biomed Res Int* 2015, 734127.
122. www.clinicaltrials.gov. Kennung: NCT00891280 & NCT01199718.
123. Pierre, F., Chua, P. C., O'Brien, S. E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Michaux, J., Nagasawa, J., Schwaebe, M. K., Stefan, E., Vialettes, A., Whitten, J. P., Chen, T. K., Darjania, L., Stansfield, R., Anderes, K., Bliesath, J., Drygin, D., Ho, C., Omori, M., Proffitt, C., Streiner, N., Trent, K., Rice, W. G., Ryckman, D. M. (2011) Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer, *J Med Chem* 54, 635-654.

124. Cozza, G., Mazzorana, M., Papinutto, E., Bain, J., Elliott, M., di Maira, G., Gianoncelli, A., Pagano, M. A., Sarno, S., Ruzzene, M., Battistutta, R., Meggio, F., Moro, S., Zagotto, G., Pinna, L. A. (2009) Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2, *Biochem J* 421, 387-395.
125. www.clinicaltrials.gov. Kennung: NCT01639638 & NCT01639625.
126. Solares, A. M., Santana, A., Baladron, I., Valenzuela, C., Gonzalez, C. A., Diaz, A., Castillo, D., Ramos, T., Gomez, R., Alonso, D. F., Herrera, L., Sigman, H., Perea, S. E., Acevedo, B. E., Lopez-Saura, P. (2009) Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies, *BMC Cancer* 9, 146.
127. Zanin, S., Sandre, M., Cozza, G., Ottaviani, D., Marin, O., Pinna, L. A., Ruzzene, M. (2015) Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects, *Biochim Biophys Acta* 1854, 1694-1707.
128. Bender, M. N. (2014) Der Einfluss von Casein Kinase 2 Inhibitoren auf neuronale Stammzellen, Hochschule Kaiserslautern, Zweibrücken, Bachelorarbeit.
129. Sahlgren, C. M., Mikhailov, A., Hellman, J., Chou, Y. H., Lendahl, U., Goldman, R. D., Eriksson, J. E. (2001) Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase, *J Biol Chem* 276, 16456-16463.
130. Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells, *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
131. Yang, Z., Wang, K. K. (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker, *Trends Neurosci* 38, 364-374.
132. Marshak, D. R., Carroll, D. (1991) Synthetic peptide substrates for casein kinase II, *Methods Enzymol* 200, 134-156.
133. Spohrer, S., Dimova, E. Y., Kietzmann, T., Montenarh, M., Götz, C. (2016) The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA, *Cell Signal* 28, 23-31.
134. Ceglia, I., Flajolet, M., Rebholz, H. (2011) Predominance of CK2alpha over CK2alpha' in the mammalian brain, *Mol Cell Biochem* 356, 169-175.
135. Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., Morrison, S. J. (2002) Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness, *Neuron* 35, 657-669.
136. Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., Lopez-Barneo, J. (2007) Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body, *Cell* 131, 364-377.
137. Vandenbosch, R., Borgs, L., Beukelaers, P., Belachew, S., Moonen, G., Nguyen, L., Malgrange, B. (2009) Adult neurogenesis and the diseased brain, *Curr Med Chem* 16, 652-666.

138. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8, 315-317.
139. Janderova, L., McNeil, M., Murrell, A. N., Mynatt, R. L., Smith, S. R. (2003) Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis, *Obes Res* 11, 65-74.
140. Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Mackie, E. J., Londos, C. (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets, *J Biol Chem* 266, 11341-11346.
141. Brasaemle, D. L. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis, *J Lipid Res* 48, 2547-2559.
142. Pinna, L. A. (2003) The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2, *Acc Chem Res* 36, 378-384.
143. Hathaway, G. M., Traugh, J. A. (1979) Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases, *J Biol Chem* 254, 762-768.
144. Dahmus, M. E. (1981) Purification and properties of calf thymus casein kinases I and II, *J Biol Chem* 256, 3319-3325.
145. Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N., Chambaz, E. M. (1991) Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II, *Biochemistry* 30, 11133-11140.
146. Nakamura, T., Shiojima, S., Hirai, Y., Iwama, T., Tsuruzoe, N., Hirasawa, A., Katsuma, S., Tsujimoto, G. (2003) Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells, *Biochem Biophys Res Commun* 303, 306-312.
147. Lee, H. K., Lee, B. H., Park, S. A., Kim, C. W. (2006) The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics* 6, 1223-1229.
148. Kostelnik, K. (2010) Die Rolle der CK2 in Differenzierungsprozessen, Universität des Saarlandes, Homburg, Diplomarbeit.
149. Poulos, S. P., Dodson, M. V., Hausman, G. J. (2010) Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes, *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 1185-1193.
150. Lin, F. T., Lane, M. D. (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Genes Dev* 6, 533-544.

151. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell* 89, 331-340.
152. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M., Spiegelman, B. M. (1998) ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4333-4337.
153. Zimmer, A. (2011) Die Rolle der CK2 im Differenzierungsprozess der Adipogenese, Universität des Saarlandes, Homburg, Diplomarbeit.
154. Schwind, L. M. (2012) Die Bedeutung der Proteinkinase CK2 für die C/EBP-abhängige Signaltransduktion während der Adipogenese, Universität des Saarlandes, Homburg, Diplomarbeit.
155. Ray, A., Ray, B. K. (1994) Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation, *Mol Cell Biol* 14, 4324-4332.
156. Balamurugan, K., Sharan, S., Klarmann, K. D., Zhang, Y., Coppola, V., Summers, G. H., Roger, T., Morrison, D. K., Keller, J. R., Sterneck, E. (2013) FBXW7alpha attenuates inflammatory signalling by downregulating C/EBPdelta and its target gene Tlr4, *Nat Commun* 4, 1662.
157. Ko, C. Y., Wang, W. L., Wang, S. M., Chu, Y. Y., Chang, W. C., Wang, J. M. (2014) Glycogen synthase kinase-3beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein delta phosphorylation in astrocytes promotes migration and activation of microglia/macrophages, *Neurobiol Aging* 35, 24-34.
158. Ji, C., Chang, W., Centrella, M., McCarthy, T. L. (2003) Activation domains of CCAAT enhancer binding protein delta: regions required for native activity and prostaglandin E2-dependent transactivation of insulin-like growth factor I gene expression in rat osteoblasts, *Mol Endocrinol* 17, 1834-1843.
159. Sotelis, A., Doyon, G., Bernatchez, G., Desilets, A., Rivard, N., Asselin, C. (2005) IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity, *Biochem Biophys Res Commun* 328, 461-470.
160. Ampofo, E., Sokolowsky, T., Götz, C., Montenarh, M. (2013) Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response, *Biochim Biophys Acta* 1833, 439-451.
161. Lupp, S., Götz, C., Khadouma, S., Horbach, T., Dimova, E. Y., Bohrer, A. M., Kietzmann, T., Montenarh, M. (2014) The upstream stimulatory factor USF1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation, *Cell Signal* 26, 2809-2817.
162. Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R. M., Ye, J., Yun, Z. (2009) A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis, *Febs J* 276, 2348-2358.

163. Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., Amri, E. Z., Scheideler, M. (2009) microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma, *Biochem Biophys Res Commun* 390, 247-251.
164. Kim, S. Y., Kim, A. Y., Lee, H. W., Son, Y. H., Lee, G. Y., Lee, J. W., Lee, Y. S., Kim, J. B. (2010) miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression, *Biochem Biophys Res Commun* 392, 323-328.
165. Lee, E. K., Lee, M. J., Abdelmohsen, K., Kim, W., Kim, M. M., Srikantan, S., Martindale, J. L., Hutchison, E. R., Kim, H. H., Marasa, B. S., Selimyan, R., Egan, J. M., Smith, S. R., Fried, S. K., Gorospe, M. (2011) miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression, *Mol Cell Biol* 31, 626-638.
166. Wacker, J., Sillem, M., Bastert, G., Beckmann, M. W. (2007) *Therapieshandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 88.
167. Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., Canaider, S. (2013) An estimation of the number of cells in the human body, *Ann Hum Biol* 40, 463-471.
168. Clamp, M., Fry, B., Kamal, M., Xie, X., Cuff, J., Lin, M. F., Kellis, M., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S. (2007) Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19428-19433.
169. International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431, 931-945.
170. Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J., van Noort, V. (2013) Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications, *Mol Syst Biol* 9, 714.
171. Kim, H., Choi, K., Kang, H., Lee, S. Y., Chi, S. W., Lee, M. S., Song, J., Im, D., Choi, Y., Cho, S. (2014) Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator, *PLoS One* 9, e94978.
172. Schuurmans, C., Guillemot, F. (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon, *Curr Opin Neurobiol* 12, 26-34.
173. Imayoshi, I., Kageyama, R. (2014) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells, *Neuron* 82, 9-23.
174. Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., Kessler, J. A. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells, *Neuron* 17, 595-606.
175. Gomes, W. A., Mehler, M. F., Kessler, J. A. (2003) Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment, *Dev Biol* 255, 164-177.

176. Son, Y. H., Moon, S. H., Kim, J. (2013) The protein kinase 2 inhibitor CX-4945 regulates osteoclast and osteoblast differentiation in vitro, *Mol Cells* 36, 417-423.
177. Di-Gregorio, A., Sancho, M., Stuckey, D. W., Crompton, L. A., Godwin, J., Mishina, Y., Rodriguez, T. A. (2007) BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo, *Development* 134, 3359-3369.
178. Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D. C., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortiguera, R., Marques-Torrejon, M. A., Nakashima, K., Colak, D., Götz, M., Farinas, I., Gage, F. H. (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus, *Cell Stem Cell* 7, 78-89.
179. Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H., Honjo, T. (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate, *Neuron* 29, 45-55.
180. Chambers, C. B., Peng, Y., Nguyen, H., Gaiano, N., Fishell, G., Nye, J. S. (2001) Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors, *Development* 128, 689-702.
181. Givogri, M. I., de Planell, M., Galbiati, F., Superchi, D., Gritti, A., Vescovi, A., de Vellis, J., Bongarzone, E. R. (2006) Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury, *Dev Neurosci* 28, 81-91.
182. Ranganathan, P., Vasquez-Del Carpio, R., Kaplan, F. M., Wang, H., Gupta, A., VanWye, J. D., Capobianco, A. J. (2011) Hierarchical phosphorylation within the ankyrin repeat domain defines a phosphoregulatory loop that regulates Notch transcriptional activity, *J Biol Chem* 286, 28844-28857.
183. Chiba, S. (2006) Notch signaling in stem cell systems, *Stem Cells* 24, 2437-2447.
184. Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., Edlund, H. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation, *Nature* 400, 877-881.
185. Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F., Dotto, G. P. (2001) Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation, *Embo J* 20, 3427-3436.
186. Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., Weinmaster, G. (1996) Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway, *Development* 122, 3765-3773.
187. Hilton, M. J., Tu, X., Wu, X., Bai, S., Zhao, H., Kobayashi, T., Kronenberg, H. M., Teitelbaum, S. L., Ross, F. P., Kopan, R., Long, F. (2008) Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation, *Nat Med* 14, 306-314.

188. Nuthall, H. N., Husain, J., McLarren, K. W., Stifani, S. (2002) Role for Hes1-induced phosphorylation in Groucho-mediated transcriptional repression, *Mol Cell Biol* 22, 389-399.
189. Nuthall, H. N., Joachim, K., Stifani, S. (2004) Phosphorylation of serine 239 of Groucho/TLE1 by protein kinase CK2 is important for inhibition of neuronal differentiation, *Mol Cell Biol* 24, 8395-8407.
190. Gratton, M. O., Torban, E., Jasmin, S. B., Theriault, F. M., German, M. S., Stifani, S. (2003) Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms, *Mol Cell Biol* 23, 6922-6935.
191. Vinals, F., Reiriz, J., Ambrosio, S., Bartrons, R., Rosa, J. L., Ventura, F. (2004) BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression, *Embo J* 23, 3527-3537.
192. Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J., Joyner, A. L. (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons, *Cell* 75, 463-476.
193. Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A., Guillemot, F. (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain, *Embo J* 23, 4495-4505.
194. Intemann, J., Saidu, N. E., Schwind, L., Montenarh, M. (2014) ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945, *Cell Signal* 26, 1567-1575.
195. Bender, M., Schwind, L., Grundmann, D., Klotz, M., Martin, M., Götz, C., Montenarh, M., Schäfer, K. H. The protein kinase CK2 inhibitor CX-4945 delays proliferation and differentiation of neural stem cells, *Heliyon eingereicht*.
196. Sakamoto, M., Kageyama, R., Imayoshi, I. (2014) The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits, *Front Neurosci* 8, 121.
197. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., Berger, M. S. (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas, *N Engl J Med* 353, 811-822.
198. Piccirillo, S. G., Sottoriva, A., Watts, C. (2015) The role of sub-ventricular zone in gliomagenesis, *Aging (Albany NY)* 7, 738-739.
199. Dixit, D., Sharma, V., Ghosh, S., Mehta, V. S., Sen, E. (2012) Inhibition of Casein kinase-2 induces p53-dependent cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor (TNF α)-induced apoptosis through SIRT1 inhibition, *Cell Death Dis* 3, e271.
200. Zheng, Y., McFarland, B. C., Drygin, D., Yu, H., Bellis, S. L., Kim, H., Bredel, M., Benveniste, E. N. (2013) Targeting protein kinase CK2 suppresses pro-survival signaling pathways and growth of glioblastoma, *Clin Cancer Res* 19, 6484-6494.
201. Nitta, R. T., Gholamin, S., Feroze, A. H., Agarwal, M., Cheshier, S. H., Mitra, S. S., Li, G. (2015) Casein kinase 2 α regulates glioblastoma brain tumor-initiating cell growth through the beta-catenin pathway, *Oncogene* 34, 3688-3699.

202. Dubois, N., Willems, M., Nguyen-Khac, M. T., Kroonen, J., Goffart, N., Deprez, M., Bours, V., Robe, P. A. (2016) Constitutive activation of casein kinase 2 in glioblastomas: Absence of class restriction and broad therapeutic potential, *Int J Oncol* 48, 2445-2452.
203. Moseychuk, O., Akkiraju, H., Dutta, J., D'Angelo, A., Bragdon, B., Duncan, R. L., Nohe, A. (2013) Inhibition of CK2 binding to BMPRIa induces C2C12 differentiation into osteoblasts and adipocytes, *J Cell Commun Signal* 7, 265-278.
204. Akkiraju, H., Bonor, J., Olli, K., Bowen, C., Bragdon, B., Coombs, H., Donahue, L. R., Duncan, R., Nohe, A. (2015) Systemic injection of CK2.3, a novel peptide acting downstream of bone morphogenetic protein receptor BMPRIa, leads to increased trabecular bone mass, *J Orthop Res* 33, 208-215.
205. Akkiraju, H., Bonor, J., Nohe, A. (2016) CK2.1, a novel peptide, induces articular cartilage formation in vivo, *J Orthop Res*.
206. Miller, P. J., Dietz, K. N., Hollenbach, A. D. (2008) Identification of serine 205 as a site of phosphorylation on Pax3 in proliferating but not differentiating primary myoblasts, *Protein Sci* 17, 1979-1986.
207. Dietz, K. N., Miller, P. J., Hollenbach, A. D. (2009) Phosphorylation of serine 205 by the protein kinase CK2 persists on Pax3-FOXO1, but not Pax3, throughout early myogenic differentiation, *Biochemistry* 48, 11786-11795.
208. Dietz, K. N., Miller, P. J., Iyengar, A. S., Loupe, J. M., Hollenbach, A. D. (2011) Identification of serines 201 and 209 as sites of Pax3 phosphorylation and the altered phosphorylation status of Pax3-FOXO1 during early myogenic differentiation, *Int J Biochem Cell Biol* 43, 936-945.
209. Gonzalez, N., Moresco, J. J., Cabezas, F., de la Vega, E., Bustos, F., Yates, J. R., 3rd, Olguin, H. C. (2016) Ck2-Dependent Phosphorylation Is Required to Maintain Pax7 Protein Levels in Proliferating Muscle Progenitors, *PLoS One* 11, e0154919.
210. Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J., Konieczny, S. F. (1996) Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation, *Mol Cell Biol* 16, 1604-1613.
211. Molkenstin, J. D., Li, L., Olson, E. N. (1996) Phosphorylation of the MADS-Box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity, *J Biol Chem* 271, 17199-17204.
212. Sommercorn, J., Krebs, E. G. (1987) Induction of casein kinase II during differentiation of 3T3-L1 cells, *J Biol Chem* 262, 3839-3843.
213. Manolagas, S. C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev* 21, 115-137.

214. Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., Prockop, D. J. (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *Br J Haematol* 107, 275-281.
215. Zhao, X. Y., Chen, X. Y., Zhang, Z. J., Kang, Y., Liao, W. M., Yu, W. H., Xiang, A. P. (2015) Expression patterns of transcription factor PPARgamma and C/EBP family members during in vitro adipogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Biol Int* 39, 457-465.
216. Reznikoff, C. A., Brankow, D. W., Heidelberger, C. (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division, *Cancer Res* 33, 3231-3238.
217. Taylor, S. M., Jones, P. A. (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine, *Cell* 17, 771-779.
218. Suga, K., Saitoh, M., Fukushima, S., Takahashi, K., Nara, H., Yasuda, S., Miyata, K. (2001) Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells, *J Interferon Cytokine Res* 21, 695-707.
219. Vaziri, C., Faller, D. V. (1996) Down-regulation of platelet-derived growth factor receptor expression during terminal differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte fibroblasts, *J Biol Chem* 271, 13642-13648.
220. Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-Scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y., Cochet, C. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits, *Mol Cell Biol* 23, 975-987.
221. Wang, J., Sarkar, T. R., Zhou, M., Sharan, S., Ritt, D. A., Veenstra, T. D., Morrison, D. K., Huang, A. M., Sterneck, E. (2010) CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta, CEBPD)-mediated nuclear import of FANCD2 by IPO4 augments cellular response to DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16131-16136.
222. Kovacs, K. A., Steinmann, M., Magistretti, P. J., Halfon, O., Cardinaux, J. R. (2003) CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation, *J Biol Chem* 278, 36959-36965.
223. Ubeda, M., Habener, J. F. (2003) CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation, *J Biol Chem* 278, 40514-40520.
224. Gottesman, M. M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance, *Annu Rev Med* 53, 615-627.
225. Zanin, S., Borgo, C., Girardi, C., O'Brien, S. E., Miyata, Y., Pinna, L. A., Donella-Deana, A., Ruzzene, M. (2012) Effects of the CK2 inhibitors CX-4945 and CX-5011 on drug-resistant cells, *PLoS One* 7, e49193.

- 226. Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 361-398.
- 227. Bunting, K. D. (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells, *Stem Cells* 20, 11-20.
- 228. van Herwaarden, A. E., Schinkel, A. H. (2006) The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins, *Trends Pharmacol Sci* 27, 10-16.
- 229. Cristancho, A. G., Lazar, M. A. (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 722-734.
- 230. Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Rao, M. S., Reddy, J. K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7921-7925.
- 231. Clarke, S. L., Robinson, C. E., Gimble, J. M. (1997) CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter, *Biochem Biophys Res Commun* 240, 99-103.
- 232. Golden, D., Cantley, L. G. (2015) Casein kinase 2 prevents mesenchymal transformation by maintaining Foxc2 in the cytoplasm, *Oncogene* 34, 4702-4712.
- 233. Meng, R., Al-Quobaili, F., Muller, I., Götz, C., Thiel, G., Montenarh, M. (2010) CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity, *Cell Mol Life Sci* 67, 2481-2489.
- 234. Spohrer, S. (2016) Interaktionen der Proteinkinase CK2 mit den Transkriptionsfaktoren der USF-Familie in den β -Zellen des Pankreas, Universität des Saarlandes, Homburg, Dissertation.
- 235. Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell* 120, 15-20.
- 236. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M. (2005) Principles of microRNA-target recognition, *PLoS Biol* 3, e85.
- 237. Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T., Lai, E. C. (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution, *Nat Struct Mol Biol* 15, 354-363.
- 238. Cai, Y., Yu, X., Hu, S., Yu, J. (2009) A brief review on the mechanisms of miRNA regulation, *Genomics Proteomics Bioinformatics* 7, 147-154.
- 239. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., Enright, A. J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res* 36, D154-158.

- 240. Li, D., Chen, L., Hu, Z., Li, H., Li, J., Wei, C., Huang, Y., Song, H., Fang, L. (2014) Alterations of microRNAs are associated with impaired growth of MCF-7 breast cancer cells induced by inhibition of casein kinase 2, *Int J Clin Exp Pathol* 7, 4008-4015.
- 241. Meek, D. W., Simon, S., Kikkawa, U., Eckhart, W. (1990) The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II, *Embo J* 9, 3253-3260.
- 242. Lorenz, A., Herrmann, C., Issinger, O., Montenarh, M. (1992) Phosphorylation of wild-type and mutant phenotypes of p53 by an associated protein-kinase, *Int J Oncol* 1, 571-579.
- 243. Götz, C., Scholtes, P., Prowald, A., Schuster, N., Nastainczyk, W., Montenarh, M. (1999) Protein kinase CK2 interacts with a multi-protein binding domain of p53, *Mol Cell Biochem* 191, 111-120.
- 244. Breving, K., Esquela-Kerscher, A. (2010) The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules, *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1316-1329.
- 245. Alessi, A. F., Khivansara, V., Han, T., Freeberg, M. A., Moresco, J. J., Tu, P. G., Montoye, E., Yates, J. R., 3rd, Karp, X., Kim, J. K. (2015) Casein kinase II promotes target silencing by miRISC through direct phosphorylation of the DEAD-box RNA helicase CGH-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E7213-7222.
- 246. Schetting, S., Schwind, L., Montenarh, M. Inhibition of protein kinase CK2 prevents adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells like C3H/10T1/2 cells, *In Vorbereitung*.
- 247. Schwindling, S. L., Noll, A., Montenarh, M., Götz, C. (2004) Mutation of a CK2 phosphorylation site in cdc25C impairs importin alpha/beta binding and results in cytoplasmic retention, *Oncogene* 23, 4155-4165.
- 248. von Knethen, A., Tzieply, N., Jennewein, C., Brune, B. (2010) Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol, *J Cell Sci* 123, 192-201.
- 249. Vidal-Puig, A., Jimenez-Linan, M., Lowell, B. B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J. S., Moller, D. E. (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents, *J Clin Invest* 97, 2553-2561.
- 250. Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W., Desvergne, B. (2001) Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding, *Endocrinology* 142, 4195-4202.

9. Publikationen

Schwind, L., Zimmer, A. D., Götz, C., Montenarh, M. (2015) CK2 phosphorylation of C/EBP δ regulates its transcription factor activity, *Int J Biochem Cell Biol* 61, 81-89.

Schwind, L.*, Wilhelm, N.*, Kartarius, S., Montenarh, M., Gorjup, E., Götz, C. (2015) Protein kinase CK2 is necessary for the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Biochim Biophys Acta* 1853(10 Pt A), 2207-2216.

Intemann, J.*, Saidu, N. E.*, **Schwind, L.***, Montenarh, M. (2014) ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945, *Cell Signal* 26(7), 1567-1575.

Allah, D. R., **Schwind, L.**, Asali, I. A., Nasim, J., Jacob, C., Götz, C., Montenarh, M. (2015) A scent of therapy: Synthetic polysulfanes with improved physico-chemical properties induce apoptosis in human cancer cells, *Int J Oncol* 47(3), 991-1000.

Bender, M.*, **Schwind, L.***, Grundmann, D., Klotz, M., Martin, M., Götz, C., Montenarh, M., Schäfer, K. H. The protein kinase CK2 inhibitor CX-4945 delays proliferation and differentiation of neural stem cells, *Heliyon*, eingereicht.

Schwind, L., Nalbach, L., Zimmer, A., Götz, C., Montenarh, M. Quinalizarin is a potent agent against obesity through down-regulation of transcription factors and microRNA modulation, *In Vorbereitung*.

Schetting, S.*, **Schwind, L.***, Montenarh, M. Inhibition of protein kinase CK2 prevents adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells like C3H/10T1/2 cells, *In Vorbereitung*.

* diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

Danksagung

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Mathias Montenarh für seine Bereitschaft mich während meiner Promotion zu betreuen. Er hat immer das richtige Maß zwischen Förderung und Forderung gefunden und eine selbstständige wissenschaftliche Arbeitsweise ermöglicht. Auch Frau Prof. Dr. Claudia Götz möchte ich herzlich danken. Die regelmäßigen Gespräche mit ihnen haben enorm dazu beigetragen meine Gedanken zu ordnen und das Ziel trotz Rückschlägen nicht aus den Augen zu verlieren.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer bedanke ich mich recht herzlich für seine Bereitschaft die Zweitberichterstattung zu übernehmen und für die Möglichkeit die miRNA-Analysen bei ihm durchzuführen. Ein großes Dankeschön geht auch an Jennifer Menegatti für die Einführung in die Welt der miRNAs und ihre Zeit.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Kooperationspartner, ohne die meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Herrn Prof. Dr. Karl-Herbert Schäfer von der Fachhochschule Kaiserslautern und seiner ganzen Arbeitsgruppe, besonders Melanie Bender und Monika Martin, danke ich für die Möglichkeit Untersuchungen an neuronalen Stammzellen durchzuführen. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Erwin Gorjup und Frau Dr. Nadine Wilhelm vom Fraunhofer Institut IBMT in St. Ingbert für die Bereitstellung der mesenchymalen Stammzellen. Es war sehr interessant auch einmal Einsicht in andere Arbeitsweisen zu erhalten.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh möchte ich mich ebenfalls herzlich für das freundschaftliche Arbeitsumfeld und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Die zahlreichen wissenschaftlichen sowie die alltäglichen Gespräche haben zu meiner Arbeit beigetragen. Besonders Sarah Spohrer danke ich für ihre über die Arbeit hinausgehende Freundschaft.

Schließlich geht ein besonderer Dank an meine Familie. Auch wenn sie sich nur schwer vorstellen können, womit ich in den letzten Jahren meine Zeit verbracht habe, hatten sie immer ein offenes Ohr für mich und haben stets an mich geglaubt. Meinem Freund Dominik danke ich von Herzen für seine Unterstützung und sein Verständnis.